

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation der Stabilität der proangiogenen
Transkriptionsfaktoren c-Jun, Id1 und Id3
durch das COP9-Signalosom

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Matthias Berse
aus Cottbus

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Dubiel
2. Prof. Dr. M. Naumann
3. Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer

eingereicht: 10.05.2005

Datum der Promotion: 30.01.2006

Zusammenfassung

Für die Progression des Wachstums maligner Tumoren und ihre Metastasierung ist die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden, eine essentielle Voraussetzung. Innerhalb dieses Prozesses spielen Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei proangiogene Transkriptionsfaktoren, c-Jun, Id1 und Id3, in ihrer Stabilität gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System, der wichtigsten zellulären Proteinabbaumaschinerie, durch das COP9-Signalosom (CSN) kontrolliert werden. Das COP9-Signalosom bildet einen multimeren Proteinkomplex, der eine deutliche Sequenz- und Strukturhomologie mit dem Lid, einem Subkomplex des 26S-Proteasoms, aufweist. In Immunpräzipitationen, Dichtegradientenzentrifugationen, Far-Western-Blots und Pull-down-Experimenten konnte die Bindung sowohl von c-Jun als auch von Id3 an die Untereinheit CSN5 demonstriert werden. Id3 interagiert zusätzlich mit CSN7.

Rekombinantes c-Jun, ein bekanntes Substrat der CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD, wird in einem Ubiquitinierungs-Assay durch Curcumin, einen potenten Hemmstoff dieser Kinasen, deutlich destabilisiert. Daneben induziert Curcumin in diesem *in vitro*-System hochmolekulare Formen von c-Jun. Auch in HeLa-Zellen akkumulieren in Gegenwart von Curcumin hochmolekulare c-Jun-Abkömmlinge, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Ubiquitin-Konjugate handelt. Ferner beschleunigt Curcumin, ebenso wie die CK2- und PKD-Inhibitoren Emdodin, DRB und Resveratrol, in HeLa-Zellen den proteasomalen Abbau von c-Jun. Die c-Jun-abhängige Produktion von VEGF, dem potentesten angiogenen Wachstumsfaktor, wird durch alle vier Kinase-Hemmstoffe signifikant reduziert. Verstärkt wird dieser Effekt noch durch den proteasomalen Inhibitor MG-132, der auch allein die Synthese von VEGF supprimiert, obwohl er c-Jun stabilisiert.

Im Gegensatz zu c-Jun wird Id3 nicht von den CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert. Allerdings hemmt es in einem Kinase-Assay die Phosphorylierung von c-Jun, ICSBP und CSN2. Die Kinase-Inhibitoren Curcumin und Emodin regen in HeLa-Zellen die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von transient exprimiertem Id3 an. Die Proteolyse von endogenem Id1 durch das 26S-Proteasom wird in HeLa-Zellen ebenfalls in Anwesenheit dieser beiden Hemmstoffe stimuliert. Mittels Kotransfektion der cDNAs von Id3 und His₁₀-markiertem Ubiquitin in HeLa-Zellen konnte die Ubiquitinierung von Id3 direkt nachgewiesen

werden. Curcumin fördert die Bildung von Id3-Ubiquitin-Konjugaten, was durch Western Blots und His-Pull-down-Versuche bestätigt werden konnte. Außerdem wird Id3 durch die Überexpression von CSN2 stabilisiert.

Auf diesen Daten basiert die Schlussfolgerung, dass die CSN-abhängige Phosphorylierung den Abbau von c-Jun und der beiden Id-Proteine über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System inhibiert und dadurch ein interessantes neues Ziel einer antiangiogenen Tumorthherapie repräsentiert.

Stichwörter: COP9-Signalosom; c-Jun; Id1; Id3; Ubiquitinierung; Proteasom; VEGF; Angiogenese.

Summary

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from the existing vasculature, is a prerequisite for the progression of solid tumor growth and metastasis. Transcription factors play an important role in this process.

In this study it is shown that the COP9 signalosome (CSN) regulates the stability of the three angiogenic transcription factors c-Jun, Id1 and Id3 towards the ubiquitin/26S proteasome system, the most important protein degradation machinery in cells. The COP9 signalosome constitutes a multimeric protein complex that shares sequence homology and structural similarities with the 26S proteasome lid complex. Immunoprecipitations, separations by density gradients, far Western blots and pull-down experiments revealed that both c-Jun and Id3 physically interact with the CSN subunit CSN5. In addition, Id3 can bind to CSN7.

In an *in vitro* ubiquitination assay recombinant c-Jun, a substrate of the CSN-associated kinases CK2 und PKD, is destabilized by curcumin, a potent inhibitor of these two kinases. Furthermore, curcumin induces high molecular weight (HMW) c-Jun species. The curcumin-induced accumulation of HMW-c-Jun species, most likely ubiquitin conjugates, could be verified in HeLa cells. All tested inhibitors of the CK2 and PKD, emodin, DRB, resveratrol, as well as curcumin accelerate the degradation of c-Jun by the 26S proteasome in HeLa cells. The c-Jun-dependent expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), the most potent angiogenic factor, is significantly reduced by the four kinase inhibitors. Although it stabilizes c-Jun, MG-132, an inhibitor of the 26S proteasome, diminishes the production of VEGF and increases the suppressive effects of the kinase inhibitors.

In contrast to c-Jun, recombinant Id3 is not phosphorylated by the CSN-associated kinases CK2 and PKD. However, it inhibits c-Jun, ICSBP and CSN2 phosphorylation by the isolated CSN complex and by the recombinant CK2. The inhibitors of CSN associated kinases, curcumin and emodin, significantly induce ubiquitination and proteasome-dependent degradation of transiently expressed Id3 in HeLa cells. Proteasome-dependent degradation of endogenous Id1 in HeLa cells is also stimulated by treatment with curcumin or emodin. Ubiquitination of Id3 is shown directly by cotransfection of HeLa cells with the cDNA of Id3 and His₁₀-tagged ubiquitin. Curcumin increases Id3-ubiquitin conjugate formation, as shown by Western blotting and His-pull-downs. In addition, overexpression of CSN2 leads to stabilization of Id3 protein.

On the basis of these data it is concluded that CSN-mediated phosphorylation inhibits ubiquitination and proteasome-dependent degradation of c-Jun, Id1 and Id3. The COP9 signalosome thus represents an interesting new target for anti-angiogenic tumor therapy.

Keywords: COP9 signalosome; c-Jun; Id1; Id3; ubiquitination; proteasome; VEGF; angiogenesis.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Angiogenese.....	1
1.2	Der angiogene Wachstumsfaktor VEGF.....	3
1.2.1	<i>Die Biologie von VEGF.....</i>	<i>3</i>
1.2.2	<i>VEGF als Angriffspunkt antiangiogener Medikamente</i>	<i>5</i>
1.3	Das Onkoprotein c-Jun	6
1.3.1	<i>Struktur und Wirkmechanismus.....</i>	<i>6</i>
1.3.2	<i>Physiologische Bedeutung der AP-1-Aktivität</i>	<i>6</i>
1.3.3	<i>Die Rolle von c-Jun in der Tumor- und Angiogenese</i>	<i>8</i>
1.3.4	<i>Regulation der AP-1-Aktivität</i>	<i>9</i>
1.4	Die proangiogenen Faktoren Id1 und Id3	10
1.4.1	<i>Struktur und Wirkmechanismus.....</i>	<i>10</i>
1.4.2	<i>Physiologische Bedeutung der Id-Proteine.....</i>	<i>10</i>
1.4.3	<i>Onkogene und angiogene Eigenschaften.....</i>	<i>12</i>
1.4.4	<i>Regulation der Id-Proteine.....</i>	<i>14</i>
1.5	Das Ubiquitin/26S-Proteasom-System	14
1.5.1	<i>Architektur des 26S-Proteasoms.....</i>	<i>14</i>
1.5.2	<i>Die Ubiquitinierung von Substratproteinen</i>	<i>16</i>
1.6	Das COP9-Signalosom.....	17
1.6.1	<i>Aufbau</i>	<i>17</i>
1.6.2	<i>Intrinsische und assoziierte Aktivitäten.....</i>	<i>18</i>
2	Fragestellung und Zielsetzung	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	<i>Kits</i>	<i>23</i>
3.1.2	<i>Plasmide.....</i>	<i>23</i>
3.1.3	<i>Proteine und Enzyme</i>	<i>23</i>
3.1.4	<i>Antikörper.....</i>	<i>23</i>
3.1.5	<i>Kinase- und 26S-Proteasom-Inhibitoren.....</i>	<i>24</i>
3.1.6	<i>Sonstiges.....</i>	<i>24</i>
3.1.7	<i>Geräte</i>	<i>25</i>
3.2	Methoden.....	26

3.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämmen	26
3.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	26
3.2.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	27
3.2.4	Plasmidisolierung („Mini-Präp“ und „Maxi-Präp“).....	27
3.2.5	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	28
3.2.6	Agarosegele	28
3.2.7	Zellkultur.....	28
3.2.8	Transiente Transfektion von Id3 oder c-Jun durch Elektroporation .	29
3.2.9	Transiente Kotransfektion von Id3 und Ubiquitin und transiente Transfektion von CSN2 durch Lipofektion.....	29
3.2.10	Lyse der Zellen.....	30
3.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.2.12	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	31
3.2.13	Proteintransfer mittels Western Blot und Ponceau S-Färbung	31
3.2.14	Immundetektion.....	31
3.2.15	Expression und Aufreinigung des GST-Id3-Fusionsproteins	32
3.2.16	GST-Id3-Pull-down (Fällung von GST-Id3).....	33
3.2.17	Far-Western Blot-Analyse (Filterbindungs-Assay).....	33
3.2.18	His-Pull-down (Fällung His-markierter Proteine) mit Ni-Partikeln	34
3.2.19	Pull-down mit Dynabeads® M-280-Tosylactivated.....	34
3.2.20	Immunpräzipitation (IP)	35
3.2.21	Dichtegradientenzentrifugation (Glycerolgradient)	35
3.2.22	Kinase-Assay.....	36
3.2.23	Ubiquitinierungs-Assay.....	36
3.2.24	VEGF-ELISA	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Das CSN reguliert den Abbau und die Aktivität von c-Jun.....	38
4.1.1	c-Jun bindet an das COP9-Signalosom.....	38
4.1.2	Curcumin induziert den Abbau und die Bildung hochmolekularer Formen von c-Jun in vitro	40
4.1.3	Curcumin fördert den Ubiquitin-abhängigen Abbau von c-Jun in HeLa-Zellen	41
4.1.4	Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Abbau und die Ubiquitinierung von c-Jun	45

4.1.5	<i>Hemmstoffe der CK2 und PKD reduzieren die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen</i>	48
4.2	Regulation des Ubiquitin-abhängigen Abbaus von Id1 und Id3 durch das COP9-Signalosom	51
4.2.1	<i>Id3 bindet an das COP9-Signalosom</i>	51
4.2.2	<i>Id3 hemmt die CSN-abhängige Phosphorylierung.....</i>	52
4.2.3	<i>Curcumin induziert hochmolekulare Formen von Id3 in vitro.....</i>	53
4.2.4	<i>Curcumin destabilisiert Id3 in HeLa-Zellen und erzeugt HMW-Id3 ..</i>	54
4.2.5	<i>Hemmstoffe der CSN-assoziierten Kinasen induzieren die Ubiquitinierung und den Abbau von Id1 und Id3.....</i>	56
5	Diskussion.....	62
5.1	Das COP9-Signalosom kontrolliert den Ubiquitin-abhängigen Abbau des proangiogenen Transkriptionsfaktors c-Jun	62
5.1.1	<i>c-Jun bindet an das COP9-Signalosom.....</i>	62
5.1.2	<i>Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Abbau von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System</i>	63
5.1.3	<i>Modell des CSN-kontrollierten Abbaus von c-Jun</i>	66
5.1.4	<i>Das COP9-Signalosom reguliert die c-Jun-abhängige VEGF-Synthese.....</i>	69
5.2	Das COP9-Signalosom reguliert die Stabilität von Id1 und Id3.....	72
5.2.1	<i>Id3 bindet an das COP9-Signalosom</i>	72
5.2.2	<i>Id3 inhibiert die CSN-assoziierte Kinaseaktivität</i>	72
5.2.3	<i>Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen initiieren die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Id1 und Id3</i>	74
5.2.4	<i>Modell des CSN-abhängigen Abbaus von Id3.....</i>	75
	Literaturverzeichnis	78
	Anhang	89
	Danksagung	89
	Lebenslauf.....	90
	Publikationen.....	91
	Eidesstattliche Erklärung	92

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIP4	Atrophin-1-interacting protein 4
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp	Ampicillin
AP-1	Activating protein 1
AP-2	Activating protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ASV 17	Avian sarcoma virus 17
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bcl	B cell lymphoma/leukemia
bHLH	Basic helix-loop-helix
BSA	Bovine serum albumine
bZIP	Basische Leuzinzipper
c	Cellular
cAMP	Cyclic AMP
CBP	CREB binding protein
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	CDK-Inhibitor
CK2	Caseinkinase II (alter Name der Proteinkinase CK2)
COP	Constitutive photomorphogenesis
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response elements-binding protein
CSN	COP9-Signalosom
DCX	DDB1/Cul4A/X-box
DDB1	UV-damaged DNA-binding protein 1
DET1	De-etiolated-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRB	5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinating enzyme (=USP)
E1	Enzym 1 = Ubiquitin-aktivierendes Enzym

E2	Enzym 2 = Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E2F	E2 promoter binding factor
E3	Enzym 3 = Ubiquitinligase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
EG-VEGF	Endocrine gland-derived VEGF
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
Flk-1	Fetal liver kinase-1
FIt-1	FMS-like tyrosine kinase-1
GG	Glycerolgradient
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Human
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
HECT	Homologous to the E6-AP carboxyl terminus
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
His	Histidin
His-Ub	His ₁₀ -markiertes Ubiquitin
HLH	Helix-loop-helix
HMW	High molecular weight
Hsp90	Heat shock protein 90
HY5	Long hypocotyl 5
ICSBP	Interferon consensus sequence-binding protein
Id	Inhibitor of DNA binding / inhibitor of differentiation
IGF-1	Insulin-like growth factor 1

I κ B α	NF- κ B inhibitor α
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP-5/6-Kinase	Inositol-1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase
JAB1	Jun activation domain-binding protein 1
JAMM	JAB1/MPN domain metalloenzyme
JNK	Jun N-terminal kinase
KDR	Kinase domain region
KGF	Keratinocyte growth factor
LB	Luria Bertani
Leu	Leuzin
Lys	Lysin
Maf	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	MAP kinase
MAPKK	MAPK kinase
Mdm2	Murine double minute clone 2
MEF2c	Monocyte-specific enhancer binder factor 2c
MG-132	Z-Leu-Leu-Leu-H
MMP	Matrix metalloproteinase
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPN	Mpr1/Pad1/N-terminal
mRNA	Messenger RNA
NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
NES	Nuclear export sequence
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NLS	Nuclear localization sequence
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
p53	Protein 53 kDa
PA700	Proteasom-Aktivator 700 kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS + 0,1% Tween-20

PDGF	Platelet-derived growth factor
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastoma protein
psi	Pounds per square inch
RING	Really interesting new gene
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
ROC1	Regulator of cullins-1
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Svedberg-Koeffizient
SAP-1	Stomach cancer-associated protein tyrosine phosphatase-1
SCF	Skp1/Cul1/F-box-protein
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Ser	Serin
SP-1	Specificity protein 1
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TAF	Tumour angiogenesis factor
TCA	Trichloressigsäure
TCF	Ternary complex factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylendiamin
Thr	Threonin
TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	Tumour necrosis factor α
TPA	Phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate
TRE	TPA response element
TRIP15	Thyroid-hormone-receptor-interacting protein 15
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Ub	Ubiquitin
Ub _n	Polyubiquitin
Ubp	Ubiquitin-binding protein

uPA	Urokinase plasminogen activator
uPAR	uPA receptor
USP	Ubiquitin-specific protease / Ubiquitin-Isopeptidase
UV	Ultraviolett
v	Viral
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF receptor
VPF	Vascular permeability factor

1 Einleitung

Die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden, ist eine essentielle Voraussetzung für die Progression des Wachstums maligner Tumoren. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen Wachstumsfaktoren wie VEGF, deren Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Drei derartige proangiogene Faktoren sind c-Jun, Id1 und Id3. Ihre Aktivität wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Dabei kommt der Steuerung ihres Abbaus über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System eine große Bedeutung zu. In diesen Vorgang ist ein weiterer Proteinkomplex, das COP9-Signalosom, involviert.

Im folgenden sollen die hier skizzierten Vorgänge sowie die beteiligten Proteine und Komplexe vorgestellt werden.

1.1 Angiogenese

Angiogenese beschreibt den Prozess der Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden. Eine komplexe Wechselwirkung zwischen Zellen, löslichen Faktoren und der extrazellulären Matrix bildet die Voraussetzung für den koordinierten Ablauf einer solchen Gefäßneubildung. Diese kann grob in eine Phase der Aktivierung und eine Phase der Konsolidierung unterteilt werden. Die Aktivierungsphase, die das Aussprossen eines neuen Gefäßes beschreibt, beginnt mit einer erhöhten Gefäßwandpermeabilität und der extravasalen Ablagerung von Fibrin. Es folgen die Auflösung der Gefäßwand und der Abbau der Basalmembran. Anschließend migrieren Endothelzellen in das Interstitium und dringen in die extrazelluläre Matrix ein. Endothelzellen beginnen, an der Migrationsfront zu proliferieren. Den Abschluss der Aktivierungsphase stellt die Ausbildung eines Gefäßlumens dar. Die Phase der Konsolidierung beinhaltet die Beendigung der Endothelzellproliferation und -migration, die Wiederherstellung der Basalmembran und das Einwandern von Perizyten in die Gefäßwand (Abbildung 1). Schließlich kommt es zum Blutfluss in dem neu gebildeten Gefäß (Bussolino et al., 1997; Gupta & Qin, 2003).

Um zu migrieren, zu proliferieren und die Basalmembran sowie die extrazelluläre Matrix abzubauen, verändern Endothelzellen die Struktur ihres Zytoskelettes, exprimieren spezifische Oberflächenmoleküle und bilden proteolytische Enzyme (Gupta & Qin, 2003; Kalebic et al., 1983). Des weiteren trägt auch die Rekrutie-

rung aus dem Knochenmark stammender endothelialer und hämatopoetischer Vorläuferzellen zur Angiogenese bei (Lyden et al., 2001).

Diese Vorgänge werden durch eine Vielzahl pro- und antiangiogener Faktoren stimuliert bzw. inhibiert. Dem Gleichgewicht zwischen diesen entgegengesetzt agierenden Faktoren kommt somit die entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Angiogenese zu (Folkman & Klagsbrun, 1987). Es ist dafür verantwortlich, dass im gesunden erwachsenen Organismus nur wenig neue Gefäße gebildet werden. Eine verstärkte Angiogenese kann unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Wundheilung, der Follikelreifung mit der sich anschließenden Entstehung des Corpus luteum und der Embryonalentwicklung beobachtet werden. Dagegen tritt eine pathologisch gesteigerte Angiogenese bei Psoriasis, rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie und seniler Makuladegeneration auf (Longo et al., 2002). Neben diesen nicht neoplastischen Prozessen spielt der Vorgang der Angiogenese eine überragende Rolle beim Tumorwachstum jenseits einer Größe von 2-3 mm³ und bei der Metastasierung maligner Tumoren (Gupta & Qin, 2003).

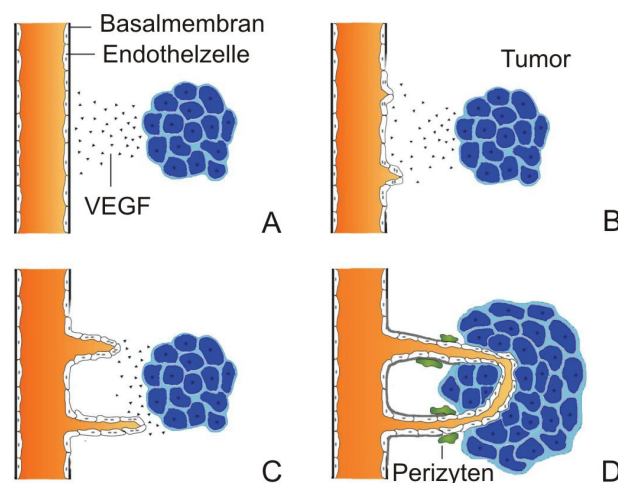


Abbildung 1: Angiogenese – die Bildung neuer Blutgefäße. **(A)** Endothelzellen werden durch proangiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF aktiviert. **(B)** Proteinase (Kollagenase, Plasminogen-Aktivator) bauen die Basalmembran des Blutgefäßes ab. **(C)** Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus. **(D)** Umhüllung der noch unreifen Blutgefäße mit einer Basalmembran und Perizyten. (modifiziert nach Wernert et al., 1999).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden eine große Anzahl sowohl pro- als auch antiangiogener Faktoren entdeckt oder das pro- bzw. antiangiogene Potential bekannter Biomoleküle nachgewiesen. Zu den die Angiogenese stimulierenden Faktoren gehören Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) oder TGF- β (transforming growth factor β), Angiopoetine sowie Proteasen, die die extra-

zelluläre Matrix und Basalmembran abbauen. Interleukine (IL-1,-6,-8,-15), TNF- α (tumour necrosis factor α) sowie den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt vermittelnde Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise Integrin $\alpha_v\beta_3$ stellen ebenfalls proangiogene Proteine dar. Antiangiogene Eigenschaften besitzen dagegen die proteolytischen Fragmente des Plasminogen und Kollagen XVIII, bezeichnet als Angiostatin und Endostatin, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), Interferone und die Interleukine 4, 10 und 12 (Gupta & Qin, 2003; Folkman & Klagsbrun, 1987; McNamara et al., 1998).

VEGF, der potenteste proangiogene Wachstumsfaktor (Ferrara, 2002), soll im folgenden Abschnitt im Hinblick auf seine biologische Wirkung, seine Signaltransduktion und seine Regulation beschrieben werden. In der Struktur und Komplexität dieser Prozesse steht er gleichzeitig stellvertretend für die Fülle der angiogenen Faktoren.

1.2 Der angiogene Wachstumsfaktor VEGF

1.2.1 Die Biologie von VEGF

Der 1989 identifizierte und sequenzierte Wachstumsfaktor, der ein spezifisches Mitogen für Endothelzellen repräsentiert und daher als VEGF bezeichnet wurde (Ferrara & Henzel, 1989), zeigte sich identisch mit dem sechs Jahre zuvor beschriebenen, die Permeabilität von Endothelzellen erhöhenden Protein VPF (vascular permeability factor) (Senger et al., 1983).

VEGF stimuliert die Gefäßneubildung, indem es die Migration und Proliferation der Endothelzellen aktiviert und gleichzeitig als Überlebensfaktor für diese Zellen in den neu formierten Gefäßen, die noch nicht mit Perizyten umhüllt sind, agiert (Ferrara, 2001). Ein weiterer wichtiger Aspekt seiner biologischen Wirkung besteht in der Fähigkeit, durch die Fenestrierung der Endothelzellen und die Lockerung der Zellkontakte die Gefäßpermeabilität zu erhöhen, was die extravasale Bildung eines Fibringels ermöglicht, das eine Matrix für die Migration von Endothel- und Stromazellen darstellt (Neufeld et al., 1999). Daneben übt VEGF auch Effekte auf andere Zelltypen aus, wie beispielsweise die Stimulation der Surfactantproduktion durch Alveolarepithelzellen Typ II oder die Anregung der Chemotaxis von Monozyten (Ferrara et al., 2003).

VEGF gehört zu einer Genfamilie, die neben VEGF (=VEGFA) noch VEGFB, PlGF (placental growth factor) sowie die die Lymphangiogenese regulierenden Faktoren

VEGFC und VEGFD beinhaltet (Neufeld et al., 1999). Durch alternatives Splicing werden aus dem VEGF-Gen die Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ und die weniger häufigen VEGF₁₄₅ und VEGF₁₈₃ generiert (Ferrara et al., 2003), wobei die nachgestellte Zahl jeweils die Anzahl der Aminosäuren angibt. Von den prädominanten Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ besitzt VEGF₁₆₅ die höchste biologische Wirksamkeit (Ferrara, 2001). Kürzlich gelang es, mit der Entdeckung von EG-VEGF (endocrine gland-derived VEGF) die VEGF-Familie um den ersten gewebsspezifischen Wachstumsfaktor – sowohl hinsichtlich seiner Expression als auch bezüglich der von ihm stimulierten Endothelzellen – zu erweitern (LeCouter et al., 2001).

Seine biologische Wirkung entfaltet VEGF über zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren, VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR/Flk-1), die sich vorrangig auf Endothelzellen befinden. Nach der Bindung eines VEGF-Dimers vollziehen zwei Rezeptoren eine Homo- oder Heterodimerisierung. Im nächsten Schritt werden zytoplasmatische Tyrosinreste autophosphoryliert. Die dadurch aktivierten intrazellulären Signalkaskaden führen schließlich zur Bildung von Proteasen, die die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix abbauen, zur Expression von Integrinen, zur Aktivierung antiapoptotischer Signalwege und letztlich zur Proliferation und Migration der Zellen (Neufeld et al., 1999).

Um ihre VEGF-Sekretion zu regulieren, bedient sich die Zelle vielfältiger Mechanismen. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Induktion der Transkription des VEGF-Gens durch Hypoxie (Shweiki et al., 1992), die hauptsächlich über die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) vermittelt wird (Levy et al., 1995). Weitere externe Stimulatoren der VEGF-Produktion sind die Wachstumsfaktoren EGF (epidermal growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), FGF und PDGF oder die Zytokine TNF- α (tumour necrosis factor α), IL-1(β) und IL-6 (Neufeld et al., 1999). Ebenso können Mutationen verschiedener Onkogene, beispielsweise von Ras und Bcl2, zu einer vermehrten VEGF-Bildung führen (Ferrara et al., 2003). Am Ende der intrazellulären Signalübertragung steht jeweils die verstärkte Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 oder SP-1 (Pollmann et al., 2001). Das Tumorsuppressorprotein p53 unterdrückt auf vielfältige Weise die Angiogenese und die Expression von VEGF. Eine in vielen Tumoren zu beobachtende Reduktion von p53 ist daher neben der Entstehung auch für die Wachstumsprogression und Metastasierung von Malignomen verantwortlich (Kerbel & Folkman, 2002).

1.2.2 VEGF als Angriffspunkt antiangiogener Medikamente

Das tiefere Verständnis der molekularen Grundlagen der Angiogenese im Allgemeinen und der Biologie von VEGF im Speziellen ermöglichte es, neue therapeutische Strategien zur Bekämpfung maligner Tumoren und anderer pathologischer Prozesse, in denen die Angiogenese eine bedeutende pathogenetische Rolle spielt, zu entwickeln. Diese Konzepte besitzen gegenüber der konventionellen Chemotherapie den Vorteil, als Angriffspunkt zirkulatorisch gut erreichbare Endothelzellen zu besitzen, die genetisch stabil sind und deshalb nur mit geringer Wahrscheinlichkeit Mutationen akkumulieren, die zur Resistenz gegenüber den verwendeten Medikamenten führen (Kerbel & Folkman, 2002). Hinzu kommt, dass sich das Tumorendothel strukturell, in Bezug auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und hinsichtlich seiner Aktivität, die sich in einer fünfzigfach höheren Teilungsrate ausdrückt, von normalem Endothel unterscheidet. Diese Differenz kann zu einer erwünschten relativen Spezifität antiangiogener Wirkstoffe beitragen (Longo et al., 2002).

Folgende den Wirkmechanismus von VEGF beeinflussende Ansätze werden gegenwärtig in klinischen Untersuchungen getestet: monoklonale Antikörper gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren, die Signaltransduktion von VEGF unterdrückende Inhibitoren der VEGFR-Tyrosinkinasen, Antisenseoligonukleotide und gegen die mRNA der VEGF-Rezeptoren gerichtete Ribozyme (Longo et al., 2002). Beispielsweise konnte für Bevacizumab, einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF, in einer prospektiven randomisierten doppelblinden placebokontrollierten Studie der Phase II – der ersten derartigen Untersuchung für einen Inhibitor der Angiogenese – für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eine Verlangsamung der Tumorprogression bei minimaler Toxizität nachgewiesen werden (Yang et al., 2003). Kürzlich wurde Bevacizumab von der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) für die Behandlung metastasierter Kolon- und Rektumkarzinome in Kombination mit einer auf Fluorouracil basierten Chemotherapie zugelassen (Sobrero & Bruzzi, 2005). Daneben stellen auch nicht neoplastische Erkrankungen, wie zum Beispiel die senile Makuladegeneration, ein vielversprechendes Einsatzgebiet für VEGF-Inhibitoren dar (Krzystolik et al., 2002).

Mit dem entgegengesetzten Ziel, nämlich der Stimulierung der Angiogenese, wird versucht, das Gefäßwachstum fördernde Potential von VEGF zur Therapie koronarer und Gliedmaßenischämie (Henry et al., 2003; Makinen et al., 2002) sowie

zur Beschleunigung der Revaskularisierung von schlecht heilenden Frakturen (Street et al., 2002) zu nutzen.

1.3 Das Onkoprotein c-Jun

1.3.1 Struktur und Wirkmechanismus

C-Jun konnte vor über 15 Jahren als zelluläres Homolog des viralen Onkoproteins v-Jun, welches vom avian sarcoma virus 17 (ASV 17) kodiert wird, identifiziert werden (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987a,b). Das 334 Aminosäuren umfassende und 39 kDa große Protein ist die häufigste monomere Komponente des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 (activating protein-1). Dieser umfasst c-Jun-Homodimere ebenso wie Heterodimere, die sich aus Vertretern der Jun- (c-Jun, JunB, JunD), Fos-, ATF (activating transcription factor)- und Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma)-Familie bilden. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilien gehören wie c-Jun zur Klasse der basischen Leuzinzipper (bZIP), die über eine leuzinreiche Region dimerisieren, über ein gleichfalls C-terminal gelegenes basisches Motiv die DNA binden und mittels einer N-terminalen Domäne die Transkription aktivieren (Shaulian & Karin, 2001). AP-1 Proteine binden hauptsächlich an die als TRE (phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate [TPA] response element) bezeichnete DNA-Sequenz (Angel et al., 1987). Daneben existieren noch weitere Sequenzen, wie beispielsweise CRE (cAMP response element), die analog den TREs von verschiedenen AP-1 Proteinen mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden (Eferl & Wagner, 2003).

1.3.2 Physiologische Bedeutung der AP-1-Aktivität

AP-1 trägt zur Aufrechterhaltung der basalen Genexpression bei. Daneben kann seine Aktivität durch diverse Stimuli induziert werden. Als ein solcher Stimulator konnte zuerst der Phorbolester TPA beschrieben werden, doch auch Serum, Wachstumsfaktoren, Onkoproteine (v-Src oder Ha-Ras), Zytokine (TNF- α und IL-1) sowie Neurotransmitter und Hormone bewirken eine Steigerung der AP-1-Aktivität (Angel et al., 1987; Shaulian & Karin, 2001). Darüber hinaus führt genotoxischer Stress, insbesondere kurzweilige UV-Strahlung, zu einer verstärkten Expression von *c-jun* und *c-fos* (Devary et al., 1991).

Auf verschiedenen Wegen der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signal-

transduktionskaskade werden die extra- und auch intrazellulären Stimuli weitergeleitet und so in eine Zunahme der AP-1-Aktivität übersetzt (Abbildung 2). Die deregulierte Expression von Onkogenen wie *Ha-ras* entkoppelt durch die anhaltende Stimulation bestimmter Kinasen der MAPK-Familie die Induktion von AP-1 von extrazellulären Signalen (Shaulian & Karin, 2002). Einen weiteren wichtigen Mechanismus zur Potenzierung der AP-1-Aktivität stellt die Phosphorylierung seiner Komponenten dar (Musti et al., 1997).

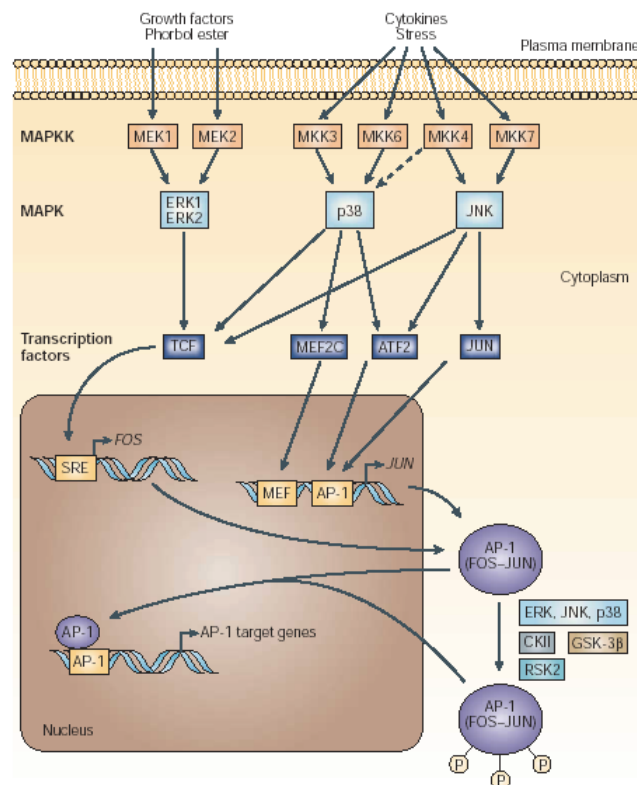


Abbildung 2: Transkriptionale und posttranslationale Aktivierung von AP-1. Die AP-1-Aktivität wird durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen stimuliert. Wachstumsfaktoren und Phorbol-ester führen über vorgeschaltete Kinaseketten zu einer Aktivierung der MAPK-Untergruppe ERK (extracellular signal-regulated kinase), deren Mitglieder ihrerseits TCFs (ternary complex factors) phosphorylieren (Hill et al., 1994) und auf diese Weise eine gesteigerte Transkription von *c-fos* bewirken. Das neu synthetisierte c-Fos interagiert mit c-Jun und erzeugt über AP-1-Bindungsstellen im *c-jun*-Promotor auch eine erhöhte *c-jun*-Transkription (Angel et al., 1988). Zytokine und UV-Strahlung hingegen bedienen sich für ihre Signaltransduktion zweier anderer MAP-Kinasen, p38 und JNK (c-Jun N-terminal kinase). Ihre Substrate, ATF2, MEF2c (monocyte-specific enhancer binder factor 2c) und c-Jun, induzieren auf direktem Weg die Expression von *c-jun* (Karin, 1995). Posttranslational wird die AP-1-Aktivität durch verschiedene Kinasen reguliert. Ihre Phosphorylierung verändert das Transaktivierungspotential, die DNA-Affinität und die Proteinstabilität von AP-1. Abkürzungen, die nicht im Text vorkommen: CKII=casein kinase 2, GSK-3β=glycogen synthase kinase 3β, MAPKK=MAPK kinase, RSK2=ribosomal S6 kinase 2, SRE=serum response element (aus Eferl & Wagner, 2003)

Die Verwandtschaft von c-Jun mit dem viralen Onkoprotein v-Jun sowie seine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren und zelluläre Onkoproteine führte frühzeitig zu der Annahme, dass c-Jun eine wichtige Rolle im Prozess der Zellproliferation

und -transformation spielen könnte. C-Jun ist in der Lage, immortalisierte Nager-Fibroblasten zu transformieren und bei der Transformation von embryonalen Fibroblasten mit Ha-ras zu kooperieren. Mittels Antikörper-Mikroinjektion und antisense-RNA konnte die Abhängigkeit der Zellzyklusprogression und Zellproliferation von einer intakten c-Jun-Funktion gezeigt werden (Shaulian & Karin, 2001).

Daneben scheint c-Jun aber auch den entgegengesetzten Prozess, die Apoptose, zu steuern. Beispielsweise erfordert die Einleitung der Apoptose von Nervenzellen oder die Induktion des programmierten Zelltodes durch UV-Strahlung eine regelrechte c-Jun-Aktivität. Die gesteigerte Apoptoserate von *c-jun*^{-/-}-Fibroblasten und von Hepatozyten in *c-Jun*^{-/-}-Mäusen belegt andererseits die antiapoptotischen Eigenschaften von c-Jun (Shaulian & Karin, 2001).

Wichtige Effektorproteine, die die proliferationsfördernden und apoptoseregulierenden Eigenschaften von c-Jun vermitteln und deren Expression von c-Jun stimuliert wird, sind Cyclin D1, ein Aktivator der cyclinabhängigen Kinase CDK4 (cyclin dependent kinase 4), die Wachstumsfaktoren GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) und KGF (keratinocyte growth factor), die proapoptotischen Proteine Fas-Ligand (FasL) und BIM sowie ihr antiapoptotischer Gegenspieler Bcl3 (Shaulian & Karin, 2001). Andererseits besitzt c-Jun auch die Fähigkeit, die Transkription bestimmter Gene zu hemmen – ein als Transrepression bezeichneter Prozess. Dazu zählen die Gene des Tumorsuppressorproteins p53, des von p53 induzierten CDK-Inhibitors (CDKI) p21^{cip1/waf1}, des CDKI p16^{INK4a} und des Apoptosestimulators Fas (Shaulian et al., 2000; Shaulian & Karin, 2002).

1.3.3 Die Rolle von c-Jun in der Tumor- und Angiogenese

Beachtet man die Bedeutung von c-Jun für die Proliferation, Transformation und Apoptose von Zellen, erklärt sich auch sein Einfluss auf die Initiation, Progression und Angiogenese maligner Tumoren. Obwohl, wie bereits angeführt, c-Jun in der Lage ist, Zellen zu transformieren, entwickeln transgene, c-Jun überexprimierende Mäuse keine Tumoren. Dagegen geht die verstärkte Expression von c-Fos, Fra1 oder Fra2 mit einer erhöhten Inzidenz von Osteosarkomen, Lungen- bzw. epithelialen Tumoren einher (Dunn et al., 2002; Eferl & Wagner, 2003). Wahrscheinlich spielt aber auch in diesen Fällen c-Jun eine entscheidende Rolle, da Fos-Proteine untereinander keine stabilen Dimere bilden (Shaulian & Karin, 2001). Insbesondere hängt die Entstehung von Lebertumoren und chemisch induzierten Papillomen von einer intakten c-Jun-Funktion ab (Eferl & Wagner, 2003).

Die Wichtigkeit von c-Jun und anderen AP-1-Proteinen für die Tumor- und Angiogenese lassen auch die von ihnen kontrollierten Gene erkennen. Neben den oben bereits beschriebenen kontrolliert c-Jun die Gene von HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) und EGFR (EGF receptor), die Gene der die Tumorinvasion regulierenden Proteine MMP1 (matrix metalloproteinase 1), MMP3 und CD44 sowie die Gene der proangiogenen Faktoren VEGF, uPA (urokinase plasminogen activator), uPAR (uPA receptor) und Proliferin. Dabei scheint c-Jun vorrangig für die Steuerung der Proliferation und Apoptose verantwortlich zu sein, indes die Fos-Proteine eher für die Tumordinvasion und Angiogenese erforderlich sind, allerdings wiederum im dimeren Verbund mit c-Jun (Eferl & Wagner, 2003).

1.3.4 Regulation der AP-1-Aktivität

Für die Anpassung der biologischen Wirkung von c-Jun an den zellulären Kontext ist seine korrekte Regulation von größter Bedeutung. Sie vollzieht sich auf mehreren Ebenen. Zum Einen bestimmen die Dimerisierungspartner von c-Jun die Funktion des resultierenden AP-1-Komplexes. So kann beispielsweise die durch c-Jun initiierte Zelltransformation unterteilt werden in eine durch c-Jun-ATF2-Heterodimere geregelte, Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation und in ein von c-Jun-c-Fos-Dimeren gesteuertes, Verankerungs-unabhängiges Wachstum (van Dam & Castellazzi, 2001). Einen zweiten Regulationsmechanismus stellt die Induktion der c-Jun-Transkription durch die geschilderten MAPK-Signalkaskaden dar (Abbildung 2), wobei im Rahmen der Tumorgenese dem ERK-Signalweg die Rolle eines positiven Regulators zukommt, p38 aber hauptsächlich von tumorsuppressiven Signalen aktiviert wird. Die MAP-Kinasen der JNK-Familie sind in beide Prozesse involviert. Gerade für die Zelltransformation und Tumorgenese ist ein dritter Zusammenhang bedeutsam: die Interaktion von c-Jun mit Onkoproteinen wie Ha-Ras. Viertens können nukleäre Rezeptoren durch Transrepression die Transkription von AP-1-Zielgenen hemmen (Eferl & Wagner, 2003).

Als Fünftes repräsentiert die posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung einen ebenfalls sehr einflussreichen Regulationsvorgang. Die Phosphorylierung von c-Jun durch eine der drei Isoformen der JNK bewirkt einerseits eine verstärkte Bindung von Koaktivatoren wie p300/CBP und damit eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität (Dunn et al., 2002). Auf der anderen Seite aber hemmt sie auch die Ubiquitinierung von c-Jun und verzögert dadurch seinen Abbau über das 26S-Proteasom (Musti et al., 1997; Treier et al., 1994). Hier nun greift auch das

weiter unten vorgestellte COP9-Signalosom (s. Abschnitt 1.6) in die Kontrolle der c-Jun-Stabilität ein. Die mit ihm assoziierten Kinasen CK2 und PKD phosphorylieren ebenfalls c-Jun und stabilisieren es auf diese Weise gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System (Seeger et al., 1998; Uhle et al., 2003).

1.4 Die proangiogenen Faktoren Id1 und Id3

1.4.1 Struktur und Wirkmechanismus

Die Id-Proteine, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung Id1 bis Id4 benannt, gehören zu der weit mehr als 200 Mitglieder umfassenden Familie der helix-loop-helix (HLH)-Transkriptionsfaktoren (Benezra et al., 1990; Christy et al., 1991; Riechmann et al., 1994; Sun et al., 1991). Nahezu alle HLH-Proteine besitzen neben der aus zwei α -Helices und einer dazwischen liegenden Schleife aufgebauten HLH-Domäne eine benachbarte basische Region (bHLH-Proteine). Die ubiquitär exprimierten E-Proteine E12, E47, E2-2 und HEB bilden über ihre HLH-Domänen untereinander oder mit den für bestimmte Zelllinien spezifischen bHLH-Proteinen Homo- bzw. Heterodimere, die daraufhin mittels der beiden basischen Regionen charakteristische DNA-Sequenzen, welche als E-Box (CANNTG) oder N-Box (CACNAG) bezeichnet werden, binden und die Transkription von Genen der Zelldifferenzierung aktivieren. Id-Proteine sind ebenfalls in der Lage, mit bHLH-Proteinen Heterodimere zu formen, jedoch fehlt ihnen die basische DNA-bindende Region, wodurch die Id-bHLH-Dimere nicht mehr als Transkriptionsaktivatoren wirken können. Deshalb agieren Id-Proteine als negativ dominante Regulatoren der bHLH-Proteine. Der Name Id steht sowohl für „inhibitor of DNA binding“ als auch für „inhibitor of differentiation“ und beschreibt einerseits den Wirkmechanismus sowie andererseits die biologischen Konsequenzen dieser Wirkung (Benezra et al., 1990; Norton et al., 1998; Norton, 2000).

1.4.2 Physiologische Bedeutung der Id-Proteine

Ausgehend von der Tatsache, dass Id-Proteine die Funktion der die Zelldifferenzierung steuernden bHLH antagonisieren, erklärt sich die Beobachtung, dass die Differenzierung einer Vielzahl von Zelllinien von einem Absinken der Id-Proteine begleitet wird und dass im Gegenzug die Überexpression von Id-Proteinen zu einer Blockade der Differenzierung führt (Lasorella et al., 2001;

Ruzinova & Benezra, 2003; Sikder et al., 2003). Id-Proteine nehmen auch Einfluss auf die Richtung der Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen. Beispielsweise ist die Entwicklung von natürlichen Killerzellen und T-Zellen aus bipotenten Ursprungszellen in *Id2*-Knock-out-Mäusen in Richtung der T-Zellen verschoben (Yokota et al., 1999).

Während der Embryogenese zeigen *Id1*, *Id2* und *Id3* ein Transkriptionsmuster, das weitgehende zeitliche und gewebsbezogene Überlappungen aufweist, sich aber deutlich von dem von *Id4* unterscheidet (Norton et al., 1998). Diese Redundanz spiegelt sich auch in Knock-out-Mäusen für ein oder zwei Id-Gene wieder. Besitzen Tiere, in denen nur ein Gen ausgeschaltet wurde, einen relativ moderaten Phänotyp, so sterben *Id1-Id3*-Doppel-Knock-out-Mäuse bereits vor der Geburt (Lyden et al., 1999; Sikder et al., 2003).

Als Inhibitoren der Zelldifferenzierung agieren Id-Proteine erwartungsgemäß auch als positive Regulatoren der Zellproliferation und spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Ruhende Zellen exprimieren nur äußerst geringe Mengen an Id-Proteinen, jedoch steigen ihre Spiegel nach Stimulation der Mitose stark an (Hara et al., 1994). *Id3* wurde ursprünglich auch als ein solches „mitogen-induced early response gene“ identifiziert (Christy et al., 1991). Durch Experimente, die zeigten, dass *Id*-Antisense-Oligonukleotide und die Mikroinjektion von Anti-Id-Antikörpern die Progression des Zellzyklus hemmen, konnte die Einbettung der Id-Proteine in die Steuerung des Zellzyklus weiter bekräftigt werden (Norton et al., 1998).

Id2 und *Id4*, aber nicht *Id1* und *Id3*, sind in der Lage, das Retinoblastomprotein (pRB) zu binden (Iavarone et al., 1994). Diese Interaktion führt einerseits zur Freisetzung des an das pRB gebundenen Transkriptionsfaktors E2F, der die Transkription von S-Phase-Genen reguliert. Andererseits wird *Id2* infolge dieser Bindung von der Wechselwirkung mit seinen Zielproteinen zurückgehalten (Ladorella et al., 2000). Durch die Antagonisierung der Funktion von E-Proteinen können Id-Proteine die E2F-abhängige Expression des CDKI p21^{Cip1/Waf1}, eines negativen Regulators des Zellzyklus, unterdrücken (Prabhu et al., 1997). Id-Proteine binden und hemmen auch die ETS-domänehaltigen Proteine SAP-1 und ELK-1, die als Komponenten des TCF die „immediate early genes“ *c-fos* und *egr-1* aktivieren (Yates et al., 1999). Da *Id1* und wahrscheinlich auch *Id3* andererseits durch EGR-1 stimuliert werden (Tournay & Benezra, 1996), entsteht so eine negative Rückkopplungsschleife (Abbildung 3).

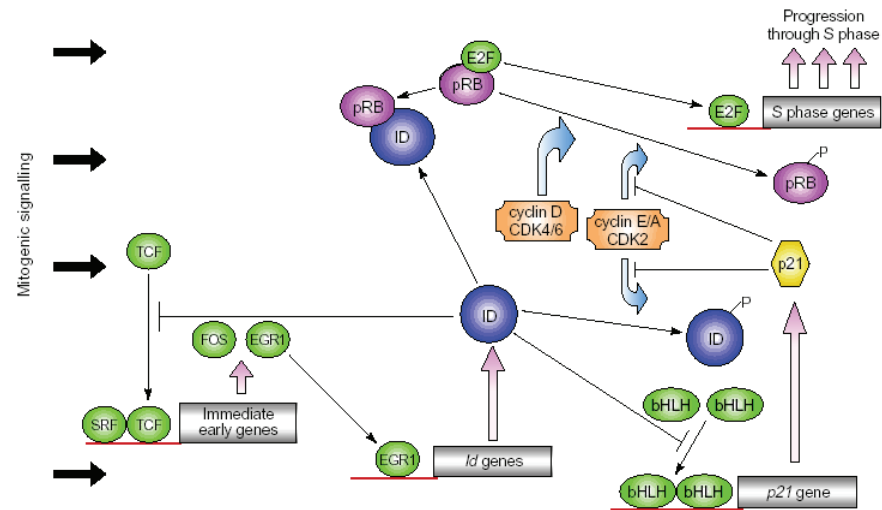


Abbildung 3: Funktion der Id-Proteine im Zellzyklus. Während der G1-Phase aktivieren mitogene Signale cyclinabhängige Kinasen (CDK). Diese phosphorylieren sequentiell das Tumorsuppressorprotein pRB, das daraufhin Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie freigibt, die die Expression von S-Phase-Genen induzieren. Id2 und Id4 interagieren mit pRB und bewirken auf diesem Weg die Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung von Id2, Id3 und Id4 durch die CDK2 verändert ihre Affinität gegenüber verschiedenen bHLH. Durch die Antagonisierung der bHLH-Funktion verhindern die Id-Proteine die Transkription von CDK-Inhibitoren wie p21^{Cip1/Waf1}. In einer negativen Rückkopplungsschleife hemmen Id-Proteine Komponenten des TCF, der „immediate early genes“ wie *egr-1* aktiviert, das seinerseits die Expression der *Id*-Gene stimuliert (aus Norton, 2000).

Id1 inhibiert auch die DNA-Bindung von Ets1 und Ets2, woraus eine verminderte Expression des CDK-Inhibitors p16^{INK4a} resultiert (Ohtani et al., 2001). Interessanterweise sind Id2, Id3 und Id4 selbst Substrate der CDK2 am Übergang von der G1- zur S-Phase (Deed et al., 1997; Hara et al., 1997). Diese Phosphorylierung verändert ihre Aktivität und die Bindungsspezifität gegenüber verschiedenen bHLH-Proteinen und ist für die Zellzyklusprogression von entscheidender Bedeutung (Abbildung 3).

1.4.3 Onkogene und angiogene Eigenschaften

Auf der Basis der proliferationsfördernden Eigenschaften der Id-Proteine im physiologischen Kontext lässt sich nun verstehen, dass ihre deregulierte Expression zur Tumorentstehung und -progression beitragen kann. In primären Keratinozyten führt die Überexpression von *Id1* über eine Aktivierung der Telomerase sowie die Inhibition von p16^{INK4a} und pRB zur Immortalisierung der Zellen (Alani et al., 1999). Dagegen kann *Id3* embryonale Fibroblasten nur nach Kotransfektion mit den antiapoptotischen Genen *Bcl2* oder *BclXL* immortalisieren (Norton & Atherton, 1998). Dies weist gleichzeitig auf das proapoptotische Potential der Id-

Proteine hin und schlägt eine Brücke zu Onkoproteinen wie Myc, die ebenfalls die Apoptose einleiten können (Sikder et al., 2003). In einer Vielzahl maligner Tumoren konnte eine verstärkte Expression einer oder mehrerer Id-Proteine nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich für bestimmte Tumorentitäten eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Id-Expression und dem Verlust des histologischen Differenzierungsgrades. Außerdem gelang es, in transgenen Mäusen durch gewebsspezifische Überexpression von *Id1* oder *Id2* T- und B-Zell-Lymphome sowie intestinale Adenome zu induzieren (Sikder et al., 2003). Die exogene Überexpression von *Id1* bewirkt nicht nur, dass Brustdrüsenepithelzellen die Basalmembran durchbrechen, sondern auch, dass eine nicht aggressive Mammakarzinomzelllinie einen aggressiveren Phänotyp annimmt (Desprez et al., 1998; Lin et al., 2000).

Neben ihrer Bedeutung für die Tumorzellen selbst konnte von Lyden et al. erstmals auch die Stellung der Id-Proteine im Prozess der Tumorangiogenese genauer bestimmt werden. Knock-out-Mäuse, denen nur ein Allel des *Id1*- oder *Id3*-Genes fehlte, wiesen bereits eine dramatische Reduktion der Vaskularisierung subkutan implantierter Tumoren auf, wodurch letztendlich das Wachstum und die Metastasierung dieser Tumoren deutlich beeinträchtigt wurden (Lyden et al., 1999). Da diese Defekte durch die Transplantation gesunden Knochenmarks aufgehoben werden konnten, ließ sich als Ursache der gestörten Tumorangiogenese eine eingeschränkte VEGF-abhängige Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen und Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark *Id1*- bzw. *Id3*-defizienter Mäuse identifizieren (Lyden et al., 2001). Anders stellt sich jedoch die Situation für autochthon wachsende Tumoren dar. In einem *Id*-defizienten Umfeld entstehen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit ähnlicher Häufigkeit Malignome, die nur bei bestimmten Tumorentitäten einen veränderten Phänotyp, vermehrt abnormale Gefäße oder im Fall HER2-abhängiger Mammakarzinome auch eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hsp90-Inhibitoren besitzen (de Candia et al., 2003; Li et al., 2004; Ruzinova et al., 2003). Somit scheinen im Kontext orthotop entstehender Tumoren aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen nur einen geringen Betrag zur Tumorangiogenese zu leisten. Als von *Id1* regulierte proangiogene Proteine konnten das Integrin $\alpha_6\beta_4$, der FGF-Rezeptor-1 und die MMP-2 nachgewiesen werden (Ruzinova et al., 2003). Gleichzeitig supprimiert es auch die Expression des antiangiogenen Faktors Thrombospondin-1 (Volpert et al., 2002).

1.4.4 Regulation der Id-Proteine

Neben der Stimulation der *Id*-Transkription durch extrazelluläre Mitogene, die vornehmlich den MAPK-Signalweg aktivieren, und der Hemmung der Id-Expression durch antiproliferative Signale wie TGF- β spielen für die Regulation der Id-Proteine auch posttranslationale Mechanismen eine entscheidende Rolle (Lasorella et al., 2001; Ruzinova & Benezra, 2003). Id-Proteine werden über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System abgebaut und haben eine Halbwertszeit von ca. 60 min (Bounpheng et al., 1999). Die Heterodimerisierung mit bHLH-Proteinen verzögert einerseits den Abbau der Id-Proteine und nimmt andererseits auch Einfluss auf ihre subzelluläre Lokalisation (Bounpheng et al., 1999; Deed et al., 1996).

1.5 Das Ubiquitin/26S-Proteasom-System

Wie im Fall der Transkriptionsfaktoren c-Jun, Id1 und Id3 angedeutet wurde, stellt der koordinierte Proteinabbau ein wichtiges Werkzeug zur Regulation der biologischen Wirkung dieser Proteine dar. Ebenso kann durch den kontrollierten Abbau anderer Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, p53, c-Fos, c-Myc und HIF1 α , die von diesen Faktoren abhängige Genexpression beeinflusst werden (Almond & Cohen, 2002; Ciechanover, 1994). Der äußerst dynamische Prozess der Zellzyklusprogression wird durch die synchronisierte Proteolyse der Cycline und der Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen erst ermöglicht (Hershko, 1997). Aber auch falsch synthetisierte, nicht korrekt gefaltete oder posttranslational beschädigte Proteine werden durch die intrazelluläre Proteinabbaumaschinerie umgehend eliminiert, um die Entstehung zelltoxischer Proteinakkumulate zu verhindern (Goldberg, 2003).

1.5.1 Architektur des 26S-Proteasoms

In den skizzierten Szenarien des intrazellulären Proteinabbaus spielt das Ubiquitin/26S-Proteasom-System die zentrale Rolle (Brooks et al., 2000). Dabei werden die entsprechenden Proteine durch eine Polyubiquitinkette für den Abbau markiert und anschließend über das 26S-Proteasom abgebaut.

Das 26S-Proteasom ist ein ca. 2000 kDa großer multimerer Proteinkomplex. Sein katalytischer Kern, bezeichnet als 20S-Proteasom, besteht aus vier heptameren Ringen, die durch ihre stapelförmige Anordnung dem 20S-Proteasom die Form

eines Zylinders verleihen. Die zwei inneren Ringe setzen sich aus sieben β -Untereinheiten, die zwei äußeren aus sieben α -Untereinheiten zusammen. Jeweils drei der sieben β -Untereinheiten besitzen die für den Proteinabbau notwendige proteolytische Aktivität (Almond & Cohen, 2002; Ciechanover, 1994). Abzubauen Proteine erhalten nur über einen engen Kanal im Zentrum der α -Ringe Zutritt zum katalytischen Zentrum des 20S-Proteasoms. Dieser Kanal ist normalerweise verschlossen, kann aber durch den 19S-Regulator (PA700), der an einem oder beiden Enden an den 20S-Zylinder bindet und so gemeinsam mit dem 20S-Proteasom das 26S-Proteasom formt, geöffnet werden (Abbildung 4).

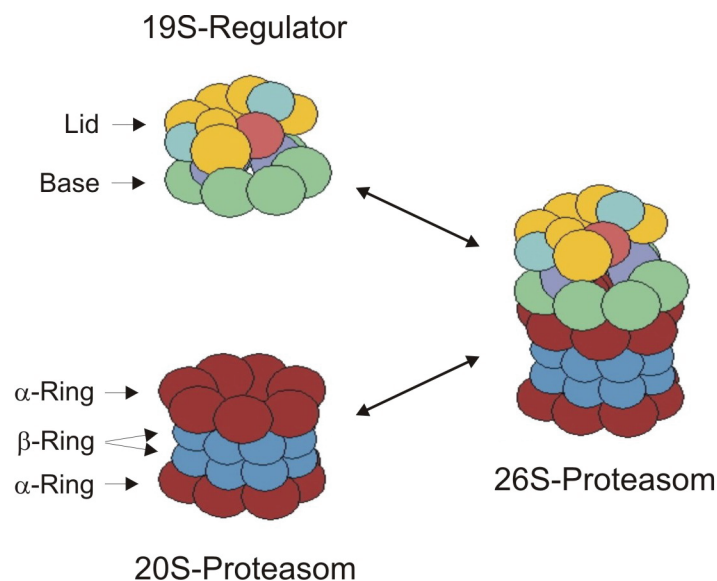


Abbildung 4: Das 26S-Proteasom und seine Subkomplexe. Das 26S-Proteasom setzt sich aus dem 20S-Proteasom und dem 19S-Regulator, der auf einer oder auf beiden Seiten an das 20S-Proteasom bindet, zusammen. Das zylinderförmige 20S-Proteasom besteht aus zwei äußeren und zwei inneren Ringen, den α - bzw. β -Ring, die jeweils aus sieben Untereinheiten aufgebaut sind. Der 19S-Regulator kann in zwei weitere Subkomplexe untergliedert werden – die als Base bezeichnete Basis und die Lid genannte Kappe.

Der 19S-Regulator ist seinerseits aus zwei Subkomplexen aufgebaut – der mit dem α -Ring in Verbindung stehenden Basis (Base) und der darauf aufsitzenden Kappe (Lid) (Abbildung 4). Neben der beschriebenen Kanalöffnung kommt dabei dem Base die Aufgabe zu, die nativen, polyubiquitinierten Substratproteine zu erkennen und zu entfalten, damit sie durch die Pore im α -Ring dem Abbau zugeführt werden können. Der Lid trennt die Polyubiquitinkette vom Substrat ab und spaltet sie in ihre monomeren Bestandteile auf, die als freie Ubiquitinproteine für die Markierung weiterer Substratproteine bereitstehen (Goldberg, 2003).

1.5.2 Die Ubiquitinierung von Substratproteinen

Die Substratmarkierung mit einer Polyubiquitinkette vollzieht sich in einer Kaskade enzymatisch gesteuerter Reaktionen, in deren Verlauf Ubiquitin, ein 76 Aminosäuren großes Protein, zuerst über eine Peptidbindung mit seinem carboxy-terminalen Glycin an die ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Substratproteins gebunden wird. Nachfolgend werden weitere Ubiquitinmonomere an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines schon konjugierten Ubiquitins geknüpft – vornehmlich an Lys48. Durch das fortgesetzte Anfügen weiterer Ubiquitinproteine entsteht letztendlich eine Polyubiquitinkette am Substrat, die, um vom 26S-Proteasom erkannt zu werden, aus mindestens vier Ubiquitinmonomeren bestehen muss (Hershko & Ciechanover, 1998; Pickart, 2001).

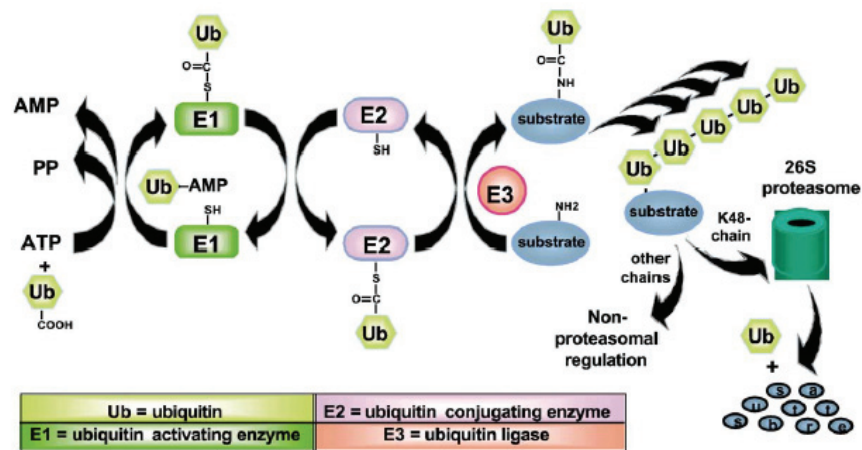


Abbildung 5: Die Multi-Enzym-Kaskade der Ubiquitinierung eines Substratproteins. Das E1 katalysiert die Aktivierung von Ubiquitin und dessen kovalente Bindung an ein Cystein des E1. Im nächsten Schritt wird Ubiquitin aus dieser Thioesterbindung auf ein Cystein des E2 übertragen. Schließlich überführt ein E3 es aus dieser zweiten Thioesterbindung auf das Substratprotein. Weitere Ubiquitinmonomere werden an Lys48 (K48) des jeweils letzten Ubiquitins der so entstehenden Polyubiquitinkette geknüpft. Das auf diese Weise markierte Substrat wird vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut (aus Pray et al., 2002).

Im ersten enzymatischen Schritt dieser Reaktionskette werden die Monomere durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 unter ATP-Verbrauch und Bildung eines Ubiquitinadenylates (Ub-AMP) aktiviert und anschließend über eine Thioesterbindung an das E1 selbst gebunden. In einer Transesterifizierungsreaktion wird Ubiquitin von dem E1 auf eines der ca. 50 verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2s) übertragen, um dann aus dieser zweiten Thioesterbindung unter Katalyse einer Ubiquitinligase (E3) auf das Substratprotein transferiert zu werden (Abbildung 5). (Hershko & Ciechanover, 1998; Pickart, 2001; Pray et al., 2002).

Der entgegengesetzte Vorgang, die Abspaltung einzelner Monomere von der Polyubiquitinkette, wird als Deubiquitinierung bezeichnet. Diese Reaktion wird von deubiquitinierenden Enzymen, DUBs (deubiquitinating enzymes) oder Ubiquitin-Isopeptidasen genannt, katalysiert (Kim et al., 2003).

1.6 Das COP9-Signalosom

1.6.1 Aufbau

Das COP9 (Constitutive photomorphogenesis 9)-Signalosom (CSN) ist ein Proteinkomplex, der vor ca. 10 Jahren als ein Gegenspieler der Photomorphogenese, der lichtabhängigen Pflanzenentwicklung, von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen identifiziert wurde (Wei et al., 1994, Wei & Deng, 1999). Nachfolgend konnte der CSN-Komplex in verschiedenen Eukaryoten – angefangen bei der Spaltheife (Mundt et al., 1999), über *Drosophila melanogaster* (Freilich et al., 1999) bis hin zu menschlichen Zellen (Seeger et al., 1998; Wei et al., 1998) – nachgewiesen werden.

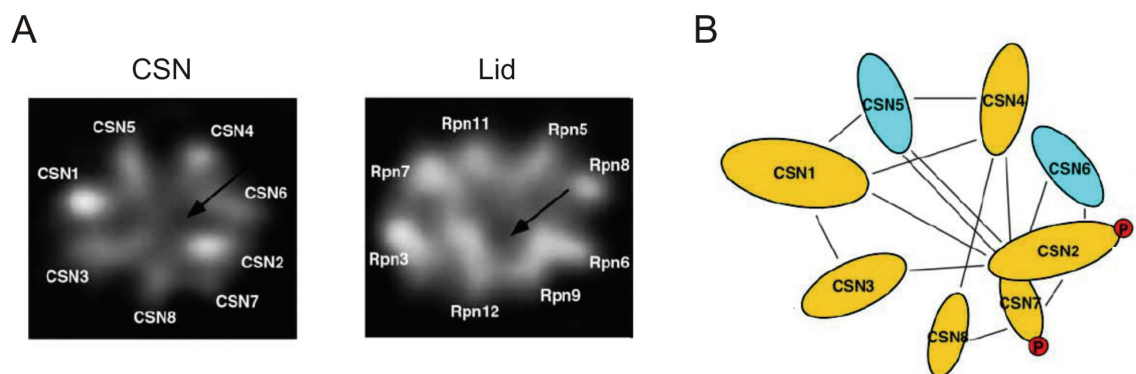


Abbildung 6: Struktur des COP9-Signalosoms. **(A)** 2D-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des CSN- und Lid-Komplexes. Eine mögliche Anordnung der CSN-Untereinheiten könnte anhand der Interaktionsstudien zwischen den Untereinheiten vorgenommen werden (Kapelari et al., 2000). Die Anordnung der Untereinheiten im Lid-Komplex wurde aus der Homologie zu den CSN-Untereinheiten abgeleitet. Der Pfeil markiert die zentrale Furchung der Komplexe. **(B)** Modell des CSN-Komplexes basierend auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (A) und den Studien zur Untereinheiteninteraktion (Kapelari et al., 2000). Die Phosphorylierung (P) von CSN2 und CSN7 ist angegeben (Modifiziert nach Bech-Otschir et al., 2002)

Der 450 kDa große Proteinkomplex setzt sich aus den acht Untereinheiten CSN1–CSN8 zusammen, zu denen auch das thyroid hormone receptor-interacting protein TRIP15 (CSN2) und das Jun activation domain-binding protein JAB1 (CSN5) gehören (Seeger et al., 1998; Wei et al., 1998). Im Zuge der Klonierung und Sequenzierung der Untereinheiten zeigte sich eine deutliche Sequenzhomologie der

CSN-Untereinheiten mit den acht Untereinheiten des Lid-Subkomplexes des 19S-Regulators (s. Abschnitt 1.5) (Glickman et al., 1998; Henke et al., 1999; Seeger et al., 1998; Wei et al., 1998). Elektronenmikroskopisch konnte dann eine, wenn auch nicht identische, so doch relativ ähnliche Architektur beider Komplexe dokumentiert werden (Abbildung 6) (Kapelari et al., 2000).

1.6.2 Intrinsische und assoziierte Aktivitäten

1.6.2.1 Die Kinaseaktivität

Mit dem COP9-Signalosom sind drei biochemische Aktivitäten assoziiert – eine Proteinkinase, eine Deneddylase und eine Ubiquitin-Isopeptidase. Bereits bei der ursprünglichen Isolierung des COP9-Signalosoms aus humanen Erythrozyten ließ sich eine Kinaseaktivität gegenüber c-Jun, IκBα und p105, dem Vorläuferprotein der NF-κB Untereinheit p50, nachweisen (Seeger et al., 1998), die effektiv durch Curcumin, dem gelben Pigment im Curry, gehemmt werden kann (Henke et al., 1999). Von den Proteinen, die mit dem COP9-Signalosom interagieren und in ihrer Mehrzahl an CSN5 binden, sind ICSBP (interferon consensus sequence-binding protein) (Cohen et al., 2000), der Tumorsuppressor p53 (Bech-Otschir et al., 2001) und der Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen p27^{Kip1} (Huang et al., unveröffentlicht) ebenfalls Substrate dieser Kinaseaktivität. Da die Untereinheiten des CSN-Komplexes selbst keine Kinaseaktivität besitzen, wird die Substratphosphorylierung durch CSN-assoziierte Kinasen katalysiert. Als eine solche Kinase konnte zuerst die Inositol-1,3,4-triphosphat-5/6-Kinase (IP-5/6-Kinase) identifiziert werden. Sie bindet an CSN1, phosphoryliert c-Jun und ist durch Curcumin hemmbar (Sun et al., 2002; Wilson et al., 2001). Kürzlich wurden mit der Caseinkinase 2 (CK2) und der Proteinkinase D (PKD) zwei weitere Kinasen beschrieben, die das COP9-Signalosom über CSN3 (CK2 und PKD) und CSN7 (CK2) binden, neben den Substraten c-Jun und p53 auch die Untereinheiten CSN2 (CK2) und CSN7 (CK2 und PKD) phosphorylieren und in ihrer Aktivität ebenfalls durch Curcumin gehemmt werden können (Uhle et al., 2003).

Die CSN-assoziierten Kinasen phosphorylieren c-Jun an den Aminosäuren Ser63 und Ser73, die im Bereich der N-terminalen Aktivierungsdomäne liegen (Seeger et al., 1998) und ebenfalls Angriffsorte der JNK sind (s. Abschnitt 1.3). Ihre Phosphorylierung durch die JNK führt über eine verminderte Ubiquitinierung zu einem verlangsamten Abbau von c-Jun durch das 26S-Proteasom. Daraus resultiert letzt-

lich eine erhöhte AP-1-Aktivität (Musti et al., 1997). Analog konnte auch für die CSN-abhängige Phosphorylierung eine Stabilisierung von c-Jun beobachtet werden, höchstwahrscheinlich wiederum als Folge einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System (Seeger et al., 1998). Eine zusätzliche Steigerung der c-Jun-Stabilität sowie der damit verbundenen AP-1-Aktivität konnte durch die Überexpression der Untereinheit CSN2 erreicht werden, die eine *de novo*-Assemblierung des CSN-Komplexes bewirkt (Naumann et al., 1999).

Indessen wird die Stabilität von p53 durch die CSN-abhängige Phosphorylierung in umgekehrter Richtung beeinflusst. Die Phosphorylierung von p53 an Ser149, Thr150 und vornehmlich Thr155 induziert, vermutlich infolge einer erhöhten Affinität des phosphorylierten p53 gegenüber seiner Ubiquitinligase Mdm2, einen beschleunigten Abbau des Tumorsuppressorproteins über das 26S-Proteasom (Bech-Otschir et al., 2001). Wie c-Jun bindet auch p53 über CSN5 an den CSN-Komplex. Eine Konkurrenz um diese Bindungsstelle erklärt möglicherweise, warum c-Jun *in vitro* die Phosphorylierung von p53 hemmen kann (Pollmann et al., 2001). Somit scheint das COP9-Signalosom im Verbund mit dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System an der Steuerung der Balance zwischen c-Jun und p53 beteiligt zu sein. Dieses Gleichgewicht ist in vielen Tumorzellen gestört. Beispielsweise ist in Zervixkarzinomzellen der p53-Abbau durch das Papillomavirusprotein E6, welches die p53-spezifische Ubiquitinligase E6-AP aktiviert, gesteigert (Scheffner et al., 1993). Als Konsequenz kann in diesen Zellen ein erhöhter c-Jun-Spiegel nachgewiesen werden, der auch für eine verstärkte VEGF-Produktion verantwortlich ist. Die Hemmung der CSN-abhängigen Phosphorylierung durch Curcumin verschiebt nun das Gleichgewicht in Richtung von p53 und lässt im Zuge des vermehrten c-Jun-Abbaus die VEGF-Synthese wieder sinken (Pollmann et al., 2001).

1.6.2.2 Deneddylase- und Ubiquitin-Isopeptidase-Aktivität

Eine weitere Verbindung zwischen dem COP9-Signalosom und dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System entsteht durch seine Wechselwirkung mit Cullin-haltigen Ubiquitinligasen, wie z.B. SCF-Komplexen (Wolf et al., 2003). Die Cullin-haltigen E3s setzen sich aus dem RING-Domänen-Protein Rbx1/ROC1/Hrt1, einem Adapterprotein, einem Gerüstprotein (Cullin) und einem, die Substratbindung gewährender F-Box-Protein zusammen. Im Fall der SCF-Komplexe handelt es sich bei dem Adapterprotein um Skp1 und bei dem Gerüstprotein um Cullin1/Cdc53,

die gemeinsam mit dem F-Box-Protein namensgebend sind (Deshaies, 1999). Cullin-haltige E3s können in ihrer Aktivität modifiziert werden. Durch einen Neddylierung genannten Prozess wird das Ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 kovalent an das Cullin gebunden, wodurch sich die Affinität des Cullins gegenüber dem E2 und die E3-Aktivität des Komplexes erhöhen. Daraus resultiert letztendlich ein beschleunigter Abbau der durch SCF-Komplexe ubiquitinierten Substrate, zu denen beispielsweise p27^{Kip1} und IκBα gehören (Deshaies, 1999; von Arnim, 2003). Über den entgegengesetzten Vorgang, die Dekonjugation des Nedd8 von dem Cullin, was auch als Deneddylierung bezeichnet wird, greift nun das COP9-Signalosom in die Regulation der Ligaseaktivität der Cullin-haltigen E3s ein. Am intensivsten ist bisher seine Interaktion mit den SCF-Komplexen untersucht worden. Über seine Untereinheiten CSN1, CSN2 und CSN6 bindet es an die SCF-Proteine ROC1 und Cullin1 (Schwechheimer et al., 2001). Anschließend bewirkt die Deneddylaseaktivität, die dem Zink-bindenden MPN+/JAMM (Mpr1-Pad1-amino-terminal+/JAB1-MPN-domain metalloenzyme)-Motiv in CSN5 zugeschrieben wird, die Abspaltung von Nedd8 von Cullin1 (Cope et al., 2002). Zur Zeit existieren zwei Modelle der Regulation der SCF-Aktivität durch Neddylierung und Deneddylierung. Das „statische Modell“ sieht in der Neddylierung die Aktivierung und in der Deneddylierung die Inaktivierung des SCF-Komplexes. Dagegen geht das „zyklische Modell“ von einer regelmäßigen Abfolge von Neddylierungen und Deneddylierungen aus, die für die Aufrechterhaltung der Ligaseaktivität verantwortlich ist (von Arnim, 2003).

Kürzlich konnte mit der Deubiquitinierung eine dritte Aktivität des COP9-Signalosoms aufgedeckt werden (Groisman et al., 2003; Zhou et al., 2003). Demnach ist das JAMM-Motiv von CSN5 nicht nur für die Deneddylierung verantwortlich, sondern auch für die Deubiquitinierung und dabei speziell für die Abspaltung des letzten Ubiquitins vom Substrat (Groisman et al., 2003). Als Träger einer Deubiquitinierungsaktivität, die ebenfalls mit dem CSN-Komplex aufgereinigt werden kann, nicht von dem JAMM-Motiv abhängt und vorrangig für die Depolymerisation der Polyubiquitinkette zuständig ist, konnten in Hefe und humanen Zellen die Ubiquitin-Isopeptidasen Ubp12 bzw. USP15 identifiziert werden (Zhou et al., 2003; Hetfeld, eingereicht bei *Curr. Biol.*). Ihre Hauptaufgabe besteht wahrscheinlich darin, der Autoubiquitinierung von F-Box-Proteinen im SCF-Komplex entgegen zu wirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das COP9-Signalosom durch seine Assoziation mit SCF-Komplexen, dem 26S-Proteasom, Proteinkinasen und Substraten eine Plattform darstellt, die zwei bedeutende intrazelluläre Prozesse, die Signaltransduktion und den Proteinabbau, miteinander verbindet (Bech-Otschir et al., 2002; Harari-Steinberg & Chamovitz, 2004; Peng et al., 2003).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion des COP9-Signalosoms bei der Regulation der proangiogenen Transkriptionsfaktoren c-Jun, Id1 und Id3. Insbesondere sollte seine Rolle im Prozess des Abbaus dieser Proteine über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System eingehender analysiert werden.

Im Fall von c-Jun sollte die bekannte Abhängigkeit seiner Proteinstabilität von der CSN-vermittelten Phosphorylierung näher erforscht werden (Henke et al., 1999; Naumann et al., 1999; Pollmann et al., 2001). Dabei galt es zu klären, ob c-Jun an das COP9-Signalosom bindet und ob die CSN-abhängige Phosphorylierung seine Stabilität dadurch erhöht, dass sie seinen Abbau über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System verlangsamt. Weiterhin sollten die Konsequenzen des CSN-kontrollierten Abbaus von c-Jun hinsichtlich der c-Jun-vermittelten Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF genauer untersucht werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Id1 und Id3 in einem Two-hybrid-System mit der CSN-Untereinheit CSN5 interagieren (Berse et al., 2004), wurde versucht, diese Wechselwirkung mit proteinbiochemischen Methoden zu bestätigen. Anschließend sollten die funktionellen Aspekte dieser Interaktion bestimmt werden. Wiederum war der Frage nachzugehen, inwieweit die CSN-abhängige Phosphorylierung den Abbau von Id1 und Id3 über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System beeinflusst.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kits

Endofree Maxi Plasmidkit	Qiagen
Mini Plasmidkit	Qiagen
VEGF ELISA	PromoKine

3.1.2 Plasmide

Id3 (pcDNA3.1)	B. Christy, University of Texas, San Antonio
HIS ₁₀ -Ubiquitin (pEGFP-N3)	M. Seeger, Charité Berlin

3.1.3 Proteine und Enzyme

Ubiquitin	Sigma
CSN	S. Uhle, Charité Berlin
c-Jun	D. Bech-Otschir, Charité Berlin
CK2	Calbiochem
PKD	Calbiochem
Restriktionsenzyme	New England Biolabs

3.1.4 Antikörper

Anti-c-Jun (polyklonal, Kaninchen)	Oncogene
Anti-Id1 (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Id3 (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GST (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-RGS-His ₆ (monoklonal, Maus)	Qiagen
Anti-CSN3 (polyklonal, Kaninchen)	R. Schade, Charité Berlin
Anti-CSN5 (monoklonal, Maus)	B. Christy, University of Texas, San Antonio
Anti-CSN8 (polyklonal, Kaninchen)	Biomol
Anti-Ubiquitin (polyklonal, Kaninchen)	Daco
Anti-Maus/Kaninchen (Peroxidase-gekoppelt)	Seramun

3.1.5 Kinase- und 26S-Proteasom-Inhibitoren

Curcumin	Sigma
Emodin	Calbiochem
Resveratrol	Calbiochem
DRB	Calbiochem
MG-132	Biomol

3.1.6 Sonstiges

3MM Filterpapier	Whatman
Acrylamid 30 %, 29:1	Roth
Aprotinin	AppliChem
[γ - ³² P]-ATP	ICN
Bacto-Agar	DIFCO
Bacto-Trypton	DIFCO
β -Mercaptoethanol	Serva
Centricon	Amicon/Millipore
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
DMSO	Fluka
Dynabeads® M-280-Tosylactivated	Dynal Biotech
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
Elektroporationsküvetten	Peqlab
FCS	Seromed
Fluorogene Proteasom Substrate	Bachem Biochemica
Glutathion-Agarose	Sigma
Hefe-Extrakt	DIFCO
IgG-Standard	New England Biolabs
L-Glutamin	Seromed
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Mikroliterspritze	Hamilton
Molekulargewichtsstandard, DNA	Gibco BRL
Molekulargewichtsstandard, Protein	Amersham Biosciences
Ni-NTA magnetic agarose beads	Qiagen
Nitrocellulose Membran	Schleicher&Schuell
pcDNA3.1 Vektor	Invitrogen

Penicillin/Streptomycin	Seromed
PMSF	Sigma
Ponceau S	AppliChem
Protein-A-Sepharose	Amersham Biosciences
Röntgenfilme (X-Omat DS, Biomax XR)	Kodak
Schwarze Mikrotiter-Platten	Dynatec
Steriles Plastikmaterial für die Zellkultur	Falcon
Sterilfilter	Microgen
TEMED	Serva
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellkultur-Medien	Seromed

3.1.7 Geräte

Agarosegelkammer Geltray	Renner
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektroporationsgerät	Peqlab
Feinwaage MC1	Satorius
Fluorimeter Fluostar Reader	SLT
French Press	SIM-AMINCO
Geltrockner Drystar	Hölzel
Heizblock	Eppendorf
Inverses Mikroskop DMI	Leica
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge RC24	Sorvall
Magnetrührer	Heidolph
Medifuge	Heraeus
Membranvakuumpumpe	Vacuumbrand
Mikrowelle	Moulinex
MilliQ-Anlage	Millipore
Mixer 5432	Eppendorf
PCR Thermocycler UNO Block	Biometra
Phast Gel System	Pharmacia
Photometer	Shimadzu

Pipetten	Gilson
Pipettus-Akku	Hirschmann
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
Rotor JA-14	Beckman
Schüttlerwasserbad	GFL
SDS-PAGE-System	Biorad
Sterilbank	Baker
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Tischultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Vakuumtrockner	Labcono
Mischer Vortex VF2	Janke & Kunkel
Waage BP2100S	Sartorius
Wasserbad U3	Julabo
Zellkultur-Inkubator BB4220CV	Heraeus

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämmen

- LB-Medium: 1% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl
- LB-Agar: 1% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Bakto-Agar
- Amp-Stammlösung: 50 mg/ml Ampicillin in 50% Ethanol
- LB-Amp-Agar: LB-Agar, 50 µg/ml Amp

Die *E. coli* -Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5-1,0 bei 600 nm (OD₆₀₀) inkubiert.

Glycerolkultur: 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde mit 1 ml sterilem 99%-igen Glycerol gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

- Transformationspuffer 1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH=6,8, eingestellt mit 0,2 M Essigsäure.

- Transformationspuffer 2: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH=7,0, eingestellt mit KOH

100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes DH5α beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gestellt und nachfolgend für 10 min bei 3900 rpm und 4°C herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem Transformationspuffer 1 resuspendiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 3900 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert und die Zellen in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden in 200 µl-Aliquoten bei -70°C gelagert.

3.2.3 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng der die Id3- oder Flag-Sequenz enthaltenden Plasmid-DNA (pcDNA3.1) wurde der Transformationsansatz 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, wonach die Zellen nochmals 2 min auf Eis gekühlt wurden. Es folgten die Zugabe von 1 ml auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium und das leichte Schütteln der Zellen für eine Stunde bei 37°C. Danach wurden die Zellen bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl LB-Medium resuspendiert, wovon schließlich ein Volumen von 50 µl auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert wurde.

3.2.4 Plasmidisolierung („Mini-Präp“ und „Maxi-Präp“)

Zur Analyse der Klone wurden von der LB-Amp-Agarplatte Einzelkolonien abgenommen und über Nacht in 3 ml LB-Amp-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen. Von dem Eluat, welches im letzten Schritt der „Mini-Präp“ gewonnen werden konnte, wurden 5 µl für die Analyse im Restriktionsenzymverdau eingesetzt. Die Verdau wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

Für die Vermehrung der Vektor-DNA wurde nach entsprechender Transformation eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. 200 ml LB-Amp-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und nochmals über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Endofree Maxiprep Plasmid Kit“ der Firma Qiagen gemäß dem vorgege-

benen Protokoll. Die Konzentration des gewonnenen Plasmids wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.2.5 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsenzymverdau der zu analysierenden Plasmid-DNA erfolgte mit den entsprechenden Enzymen und 10xPuffern der Firma New England Biolabs. Eine Enzymeinheit verdaut unter optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen 1 µg DNA in 1–3 Stunden.

3.2.6 Agarosegele

- 50xPuffer für Agarosegel-Elektrophorese (50xTAE): 242 g Tris, 57,1 ml 0,5 M Essigsäure, 100 ml EDTA (pH=8,0), H₂O auf 1 l

Die DNA-Fragmente wurden in 0,8–1,6%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Abkühlen der aufgekochten Agarose wurde Ethidiumbromid zugegeben, so dass seine Konzentration im Gel 0,75 µg/ml betrug. Die Elektrophorese erfolgte mit 5 V/cm. Zur Skalierung lief ein DNA-Molekulargewichtsstandard mit. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht nachgewiesen.

3.2.7 Zellkultur

- Zelllinie: humane HeLa-Zellen (European Tissue Culture Collection)
- Medium: RPMI 1640 Medium, 10% FCS, 100 U Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
- Curcumin-Stammlösung: 20 mM, in DMSO gelöst; Endkonzentration: 50 µM
- DRB-Stammlösung: 20 mM, in DMSO gelöst; Endkonzentration: 200 µM
- Emodin-Stammlösung: 20 mM, in DMSO gelöst; Endkonzentration: 200 µM
- Resveratrol-Stammlösung: 10 mM, in DMSO gelöst; Endkonzentration: 100 µM
- MG-132-Stammlösung: 10 mM, in DMSO gelöst; Endkonzentration: 20 µM

Die HeLa-Zellen wurden im angegebenen Medium bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Waren die Zellen konfluent, wurden sie nach einmaligem Waschen mit 1xPBS mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 200 x g für 5 min.

Für die Behandlung nicht transfizierter Zellen mit Inhibitoren der Proteinkinasen CK2 und PKD sowie dem 26S-Proteasom-Inhibitor MG-132 wurden 1,5x10⁶ Zellen

pro 60 mm-Kulturschale ausgesät. Nach 18 Stunden wurden nach Mediumwechsel die entsprechenden Inhibitoren für weitere 2–6 Stunden hinzugegeben.

3.2.8 Transiente Transfektion von Id3 oder c-Jun durch Elektroporation

In der exponentiellen Phase ihres Wachstums wurden die HeLa-Zellen nach einmaligem Waschen mit 1xPBS mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturschalen abgelöst, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend zu 3×10^7 Zellen/ml im oben beschriebenen Medium (s. Abschnitt 3.2.7) resuspendiert. Zur Transfektion wurden 300 µl dieser Suspension sowie 30 µg Id3- oder Flag-c-Jun-cDNA, welche jeweils in einen pcDNA3.1-Vektor inkorporiert waren, eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin noch 1,25% DMSO. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 210 V, einer Kapazität von 975 µF und einem Widerstand von 0Ω durchgeführt. Danach wurden alle Ansätze in einem 50 ml-Eppendorf-Röhrchen, welches frisches Medium mit 1,25% DMSO enthielt, aufgenommen und auf 60 mm-Kulturschalen verteilt, so dass jede Schale 3 ml Medium mit annähernd 3×10^6 Zellen und 10 µg DNA beinhaltete. Folglich richteten sich die Anzahl der Elektroporationsansätze und das Mediumvolumen in dem 50 ml-Eppendorf-Röhrchen nach der Zahl der eingesetzten Kulturschalen. 18 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Inkubation unter Zusatz der entsprechenden Inhibitoren für weitere 2–6 Stunden fortgesetzt.

3.2.9 Transiente Kotransfektion von Id3 und Ubiquitin und transiente Transfektion von CSN2 durch Lipofektion

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion zu $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Segment einer 6-well-Kulturschale ausgesät. Für eine Reaktion wurden 1×10^6 HeLa-Zellen, 3 µg Id3-cDNA (pcDNA3.1-Vektor), 3 µg His₁₀-Ubiquitin-cDNA (pEGFP-N3-Vektor) und 12 µl Lipofectamine™ 2000 unter Einhaltung des Protokolls der Firma Invitrogen eingesetzt. Nach vier Stunden wurden das Medium erneuert und die Zellen für weitere 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für vier Stunden wurden wahlweise 50 µM Curcumin zugegeben.

Analog wurden für die Überexpression von CSN2 1×10^6 HeLa-Zellen, 5 µg Flag-CSN2-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) und 10 µl Lipofectamine™ 2000 entsprechend dem Firmenprotokoll verwendet.

3.2.10 Lyse der Zellen

- Lysepuffer (RIPA-Puffer): 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 150 mM NaCl, 0,02% (w/v) Natriumazid, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat; 1 mM PMSF und 10 µg/ml Aprotinin wurden frisch hinzugegeben

Vor der Lyse wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen abgelöst, bei 1000 rpm und 4°C für 4 min zentrifugiert, in 1xPBS resuspendiert und nochmals für 4 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Den gewonnenen Pellets wurden 100 µl eiskalter Lysepuffer zugegeben. Zur Auflösung der Zellmembranen wurde die Suspension zusätzlich zehnmal mit einer 21-gauge Nadel angesaugt, bevor sie anschließend 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde sofort der SDS-PAGE zugeführt oder zusammen mit 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) 5 min bei 95°C aufgekocht und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)
- Acrylamid: 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 10xLaufpuffer: 250 mM Tris, 1,8 M Glycin, 1% (w/v) SDS
- 4xProbenpuffer: 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 240 mM Tris-HCl (pH=6,8), 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenol-Blau
- Molekulargewichtsstandard: Prestained High Molecular Weight Marker (Molekulargewichte: 14,3/20,1/30/45/66/97/220 kDa)

Die Proteine wurden entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen (8%, 10%, 12,5% oder 15%) aufgetrennt. Je zwei 0,75 mm dicke Gele wurden nach folgendem Schema gegossen:

- Trenngel (10%): 4,1 ml H₂O, 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,33 ml 30% Acrylamid, 100 µl SDS (10%), 50 µl APS (10%), 5 µl TEMED
- Sammelgel (5%): 1,7 ml H₂O, 750 µl Sammelgelpuffer, 500 µl Acrylamid, 30 µl SDS (10%), 15 µl APS, 3 µl TEMED

Die Proben wurden in 4xProbenpuffer aufgenommen, 5 min im Heizblock einer Temperatur von 95°C ausgesetzt und anschließend 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Um die Proteinmengen anzugleichen, erfolgte zuvor über die photo-

metrische Absorptionsmessung bei 280 nm die Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Für die Passage durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 90 V angelegt. Nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde die Spannung auf 140 V erhöht. Die gesamte Elektrophorese dauerte, in Abhängigkeit der Gelkonzentration, 1–1½ Stunden.

3.2.12 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

- Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in Methanol (40% Endkonzentration) mehrere Stunden lösen, Eisessig (10% Endkonzentration) in H₂O zugeben.
- Entfärbelösung: 10% Eisessig, 40% Methanol in H₂O

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10–30 min in die Färbelösung gegeben und danach etwa eine Stunde entfärbt. Die Gele wurden auf Whatman-Filterpapier bei 80°C für 60-90 min getrocknet.

3.2.13 Proteintransfer mittels Western Blot und Ponceau S-Färbung

- Blotpuffer: 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,02% SDS, 10% Methanol
- PBST: 1xPBS mit 0,1% Tween-20
- Ponceau S-Färbelösung: 0,2% Ponceau in 5% TCA-Lösung

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf Nitrocellulose übertragen. Der Western Blot wurde zwischen vier Lagen Filterpapier bei konstanter Stromstärke von 250 mA für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 120 mA und 4°C über Nacht durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Transfer zuerst mit Ponceau S für ca. 5 min gefärbt und danach mit 5% Milch-PBST eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum bei 4°C blockiert.

3.2.14 Immundetektion

Die Inkubation mit den primären Antikörpern, welche in 5% Milch-PBST in einem Verhältnis von 1:1000 bis 1:10000 gelöst waren, erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Membranen dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Nach der einstündigen Behandlung mit dem sekundären Antikörper, der sich entweder gegen das Fc-Fragment der Maus oder des Kaninchens richtete, in

einem Verhältnis von 1:2000 in 5% Milch-PBST gelöst und mit Peroxidase gekoppelt war, wurden die Membranen abermals dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Mit einem Lumineszenzverfahren (Enhanced Chemiluminescence [ECL] entsprechend der Firmenvorschrift) wurden die gebundenen Antikörper nachgewiesen. Die belichteten Röntgenfilme wurden entweder per Hand oder im Automaten entwickelt.

3.2.15 Expression und Aufreinigung des GST-Id3-Fusionsproteins

- Elutionspuffer: 10 mM Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH=8,0

Nach der Hitzeschocktransformation (s. Abschnitt 3.2.3) von 1 µg eines pGEX-2T-Vektors, der für das GST-Id3-Fusionsprotein (GST-Id3) kodiert, in 100 µl kompetente *E.coli*-Bakterien (DH5α) wurden diese auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zu drei Kolonien wurden je 2 ml LB-Amp-Medium hinzugegeben und erneut bei 37°C über Nacht inkubiert. Mittels Mini-Präp von 1,5 ml dieser Übernackkultur, Restriktionsenzymverdau und DNA-Auftrennung im Agarosegel wurde die korrekte Inkorporation der GST-Id3-DNA im Vektor überprüft. Die restlichen 0,5 ml der Übernackkultur wurden mit 5 ml LB-Amp-Medium versetzt und für acht Stunden bei 37°C leicht geschüttelt (100 rpm), bevor 250 µl dieser Kultur in 25 ml LB-Amp-Medium, welches zur Verminderung der basalen Expression 500 µl 50%-iger Glucose enthielt, über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

5 ml dieses Ansatzes wurden zu 300 ml LB-Amp-Medium, das wiederum 2% (v/v) 50%-iger Glucose beinhaltete, gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 geschüttelt. Nun wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 300 µl IPTG (1 M) induziert. Nachfolgend wurde die Kultur für vier Stunden bei 300 rpm und 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge (GS-3 Rotor) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem 1xPBS resuspendiert und durch dreimaligen Einsatz der French Press bei 800-1000 psi aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C (SS-34 Rotor) wurde der Überstand auf eine Säule aus 600 µl Glutathion-Agarose, die nach einstündigem Quellen der Agarose in Wasser gegossen und mit 1xPBS äquilibriert wurde, überführt. Die Säule wurde langsam dreimal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurde das Säulenvolumen mit 1xPBS im Verhältnis 1:1 vermischt, 1 ml Elutionspuffer dazugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Eluat abge-

lassen, die Proteinkonzentration photometrisch bei 280 nm bestimmt und das gewonnene Protein bei -70°C gelagert.

3.2.16 GST-Id3-Pull-down (Fällung von GST-Id3)

Zur Untersuchung der Bindung von Id3 an das COP9-Signalosom wurde GST-Id3 an eine Glutathion-Agarose-Säule gebunden, um danach den gereinigten CSN-Komplex oder die Untereinheiten CSN5 und CSN7 hinzuzugeben.

Zuerst wurden 100 µl Glutathion-Agarose mit 35 µg GST-Id3 in einer Säule bei 4°C unter Rotation inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Säule dreimal mit 1xPBS gewaschen. Als Nächstes wurde die Säule mit 20 µg CSN beladen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurde die Säule geöffnet und die Agarose in ein Eppendorf-Röhrchen dekantiert. Durch Zugabe von 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) und Erhitzen der Agarose für 5 min auf 95°C wurden die gebundenen Proteine von der Glutathion-Agarose abgelöst, bevor nach ihrer Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer durch Western Blot der immunologische Nachweis erfolgte.

In einem zweiten Ansatz wurden bei sonst analogem Ablauf statt des gesamten CSN-Komplexes 10 µg His₆-markiertes CSN5 bzw. CSN7 zu 10 µg an Glutathion-Agarose gebundenem GST-Id3 bzw. GST (Kontrolle) gegeben.

3.2.17 Far-Western Blot-Analyse (Filterbindungs-Assay)

Je 1 µg der entsprechenden rekombinanten Untereinheiten des COP9-Signalosoms wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Membranen wurden mit Ponceau S gefärbt und anschließend mit 5% Milch-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die immobilisierten Untereinheiten wurden mit rekombinantem GST-Id3 oder GST (Kontrolle), welche in einer Konzentration von 1,5 µg/ml in PBS gelöst waren, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Membranen mit dem anti-GST-Antikörper (primärer Antikörper) für zwei Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die dreimal mit PBST gewaschenen Membranen wurden nun eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem anti-Kaninchen-Antikörper (sekundärer Antikörper) inkubiert, bevor nach dem finalen Waschzyklus der enzymchemische Bindungsnachweis mit Hilfe der ECL-Technik erfolgte. Zur Kontrolle wurden die gebundenen Proteine anschließend durch die Behandlung der Membranen mit Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl [pH=6,7], 1% [w/v] SDS, 100 mM

β -Mercaptoethanol) von den Membranen abgelöst. Danach wurden die Membranen nochmals mit den gleichen Antikörpern untersucht.

3.2.18 His-Pull-down (Fällung His-markierter Proteine) mit Ni-Partikeln

- Waschpuffer: 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,05% (v/v) Tween 20, 10 mM Imidazol, 20 mM Tris-HCl, pH=7,5
- Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8,0

His-Pull-down-Experimente wurden mit magnetischen Ni-NTA-Agarosepartikeln (Ni-Partikel), die His-markierte Proteine binden, durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 μ l der Ni-Partikel-Lösung mit dem Lysat der mit His₁₀-Ubiquitin und Id3 kotransfizierten HeLa-Zellen über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden den Ansätzen je 30 μ l Elutionspuffer und 10 μ l 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) zugegeben. Die Proben wurden danach für 5 min auf 95°C erhitzt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Anschließend wurden die transferierten Proteine immunologisch nachgewiesen.

3.2.19 Pull-down mit Dynabeads® M-280-Tosylactivated

- Puffer A: 19 mM NaH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄, pH=7,4
- Puffer D: PBS (pH=7,4) + 0,1% (w/v) BSA
- Puffer E: 0,2 M Tris (pH=8,5) + 0,1% (w/v) BSA

Nach dem initialen Waschen mit Puffer A wurden pro Ansatz 50 μ l Partikellösung mit 40 μ l rekombinantem His₆-markierten CSN5 (1 μ g/ μ l) oder 40 μ l 1 M Harnstoff, da CSN5 in 1 M Harnstoff gelöst war, und 100 μ l Puffer A für 30 Stunden bei 37°C und zwölf Stunden bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden zweimal für 5 min mit Puffer D bei 4°C und anschließend für 24 Stunden mit Puffer E bei Raumtemperatur gewaschen. Bevor den Ansätzen 90 μ l Lysat von 2x10⁶ HeLa-Zellen zugegeben wurde, erfolgte nochmals ein Waschvorgang mit Puffer D für 5 min bei 4°C. Die nachfolgende Inkubation fand für 20 Stunden bei 4°C unter Rotation statt. Danach wurden die Überstände abgenommen und aufbewahrt. Die Pellets wurden dreimal für 5 min mit RIPA-Puffer gewaschen und mit 30 μ l RIPA-Puffer und 10 μ l 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) aufgefüllt. Auch 30 μ l Überstand wurden 10 μ l 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min gekocht. Abschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und immunologisch auf mittels CSN5 präzipitiertes c-Jun untersucht.

3.2.20 Immunpräzipitation (IP)

C-Jun und der CSN-Komplex wurden immunpräzipitiert. Im ersten Fall wurden zuerst 5×10^6 -HeLa-Zellen mit 10 µg Flag-markierter c-Jun-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) transient transfiziert (s. Abschnitt 3.2.8) und nach 18 Stunden lysiert (s. Abschnitt 3.2.10). Für die IP des CSN-Komplexes wurde untransfiziertes Lysat eingesetzt. Beide IPs wurden mit Protein-A-Sepharose durchgeführt.

Die IP begann mit der einstündigen Vorinkubation von 80 µl Lysat, 420 µl RIPA-Puffer und 30 µl in RIPA-Puffer gelöster Protein-A-Sepharose bei 4°C. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurden die Überstände abgenommen und zusammen mit 5 µl anti-Flag- bzw. anti-CSN7-Antikörper für zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt keinen Antikörper. Im letzten Schritt wurden jedem Ansatz 60 µl Protein-A-Sepharose für weitere zwei Stunden zugegeben. Danach wurden die Proben 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Pellets wurden viermal mit RIPA-Puffer gewaschen, bevor sie abschließend in 24 µl RIPA-Puffer und 8 µl 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) aufgenommen wurden. Von den Überständen wurden ebenfalls 24 µl entnommen und mit 8 µl 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) versetzt. Präzipitate und Überstände wurden bei 95°C für 5 min gekocht, in der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den entsprechenden Antikörpern auf Proteine untersucht, die an c-Jun bzw. CSN7 gebunden waren.

3.2.21 Dichtegradientenzentrifugation (Glycerolgradient)

- GG-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol

Die 10%-ige und 40%-ige Glycerollösung wurden in GG-Puffer hergestellt. Mit einem Gradientenmischer wurde ein kontinuierlicher Gradient von 10–40% Glycerol in Zentrifugenröhrchen gegossen (je 38 ml). Der Gradient wurde mit dem Lysat von 1×10^8 HeLa-Zellen überschichtet und bei 27000 rpm für 24 h bei 4°C zentrifugiert (Rotor SW28). 21 Fraktionen zu je 2 ml wurden gesammelt, in der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen CSN3 und CSN5 getestet.

3.2.22 Kinase-Assay

- Kinase-Assay-Puffer: 30 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, pH=7,8

Für die Kinase-Assays wurden entweder der gereinigte CSN-Komplex (1 µg) oder die rekombinanten Kinasen CK2 ($\alpha_2\beta_2$) und PKD eingesetzt. Als Substrate wurden rekombinantes c-Jun (1,5 µg), ICSPB (1,5 µg) und GST-Id3 (0,8 µg) dazugegeben. Nach Zusatz von [γ -³²P]-ATP (0,2 MBq) wurden die Proben in einem Endvolumen von 20 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 µl 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) gestoppt. Die Ansätze wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und die Proteine in der SDS-PAGE getrennt. Abschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet und mittels Autoradiographie ausgewertet.

3.2.23 Ubiquitinierungs-Assay

- ATP-, DTT- und MgCl₂-Stammlösung: 100 mM
- Tris-HCl-Stammlösung: 1 M, pH=7,5
- NaCl-Stammlösung: 2 M
- Ubiquitin-Stammlösung: 6 mg/ml

In dem *in vitro*-Ubiquitinierungs-Assay wurden als Substrate 0,2 µg rekombinantes GST-Id3 oder 0,4 µg rekombinantes c-Jun eingesetzt. Als Lieferant der ubiquitinierenden Enzyme diente das Lysat von ca. 5×10^5 HeLa-Zellen. Neben 6 µg Ubiquitin enthielten die 50 µl Probenvolumen 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM Dithiothreitol (DTT) und 2 mM ATP. Weiterhin beinhaltete der Ansatz entweder 50 µM Curcumin oder 0,25% reines DMSO zur Gewährleistung identischer DMSO-Konzentrationen. Während der achtstündigen Inkubation bei 37°C wurden zu definierten Zeiten Aliquote von 13 µl entnommen, mit 4,3 µl 4xProbenpuffer (SDS-PAGE) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und immunologischem Proteinnachweis.

3.2.24 VEGF-ELISA

Von den Medien der mit den Kinase-Hemmstoffen Curcumin, DRB, Emodin und Resveratrol sowie dem 26S-Proteasom-Hemmstoff MG-132 behandeltem HeLa-Zellen (s. Abschnitt 3.2.7) wurde nach sechs Stunden Inkubation 1 ml zellfreier Überstand abgenommen und bei -70°C gelagert. Insgesamt wurden von acht

solcher Versuchsserien Zellüberstände gewonnen. Mit einem VEGF-ELISA-Kit wurde in ihnen gemäß der Firmenvorschrift die VEGF-Konzentration bestimmt. Die in den Überständen der unbehandelten Zellen gemessenen VEGF-Konzentrationen wurden jeweils als 100% normiert. Dazu wurden die VEGF-Konzentrationen in den Überständen der mit den jeweiligen Hemmstoffen inkubierten Zellen in Relation gesetzt. Die Signifikanz der prozentualen Abweichung der VEGF-Konzentrationen wurde unter Verwendung eines t-Testes für verbundene Stichproben unter der Annahme einer Normalverteilung ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 *Das CSN reguliert den Abbau und die Aktivität von c-Jun*

4.1.1 c-Jun bindet an das COP9-Signalosom

Bereits im Rahmen der ersten Aufreinigungen des COP9-Signalosoms konnte c-Jun als Substrat der mit dem CSN-Komplex assoziierten Kinaseaktivität identifiziert werden (Seeger et al., 1998). Obwohl in den nachfolgenden Untersuchungen der enge funktionelle Zusammenhang zwischen c-Jun und der CSN-abhängigen Phosphorylierung immer deutlicher herausgearbeitet werden konnte (Henke et al., 1999; Naumann et al., 1999; Pollmann et al., 2001), wurde der endgültige Beweis für eine Bindung von c-Jun an den CSN-Komplex noch nicht erbracht.

Mit dieser Zielstellung wurden Immunpräzipitationen und Pull-down-Experimente durchgeführt. In einem ersten Versuch sollte geklärt werden, ob sich aus dem Lysat von c-Jun überexprimierenden HeLa-Zellen gemeinsam mit c-Jun die Untereinheit CSN5 präzipitieren lässt. Hierzu wurden zuerst HeLa-Zellen mit Flag-markiertem c-Jun transient transfiziert. In der Immunpräzipitation wurde anschließend aus den Lysaten dieser Zellen das so markierte c-Jun mit einem anti-Flag-Antikörper isoliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Präzipitate und dem Proteintransfer mittels Western Blot wurden in der abschließenden Immun-detektion das zusammen mit Flag-markiertem c-Jun präzipitierte CSN5 nachgewiesen (Abbildung 7A). In der Negativkontrolle, die keinen präzipitierenden Antikörper enthielt, war erwartungsgemäß kein CSN5 zu detektieren.

Die Bindung von c-Jun an CSN5 wurde in einem Pull-down-Experiment bestätigt. Während in der Immunpräzipitation die Untereinheit CSN5 durch ihre Wechselwirkung mit c-Jun aus dem Zelllysate isoliert werden konnte, sollte nun nach dem umgekehrten Prinzip versucht werden, durch an tosylaktivierte M-280-Dynabeads[®] gebundenes rekombinantes CSN5 c-Jun zu präzipitieren. Als Quelle für c-Jun diente das Lysat von 2×10^6 HeLa-Zellen. Abbildung 7B lässt erkennen, dass auch in diesem Fall c-Jun an CSN5 bindet. Wiederum war in der Negativkontrolle keine Interaktion festzustellen. Diese enthielt statt des rekombinanten CSN5 nur an die Dynabeads[®] gebundenes BSA und das äquivalente Volumen einer 1 M Harnstofflösung, da CSN5 in einer eben solchen gelöst war.

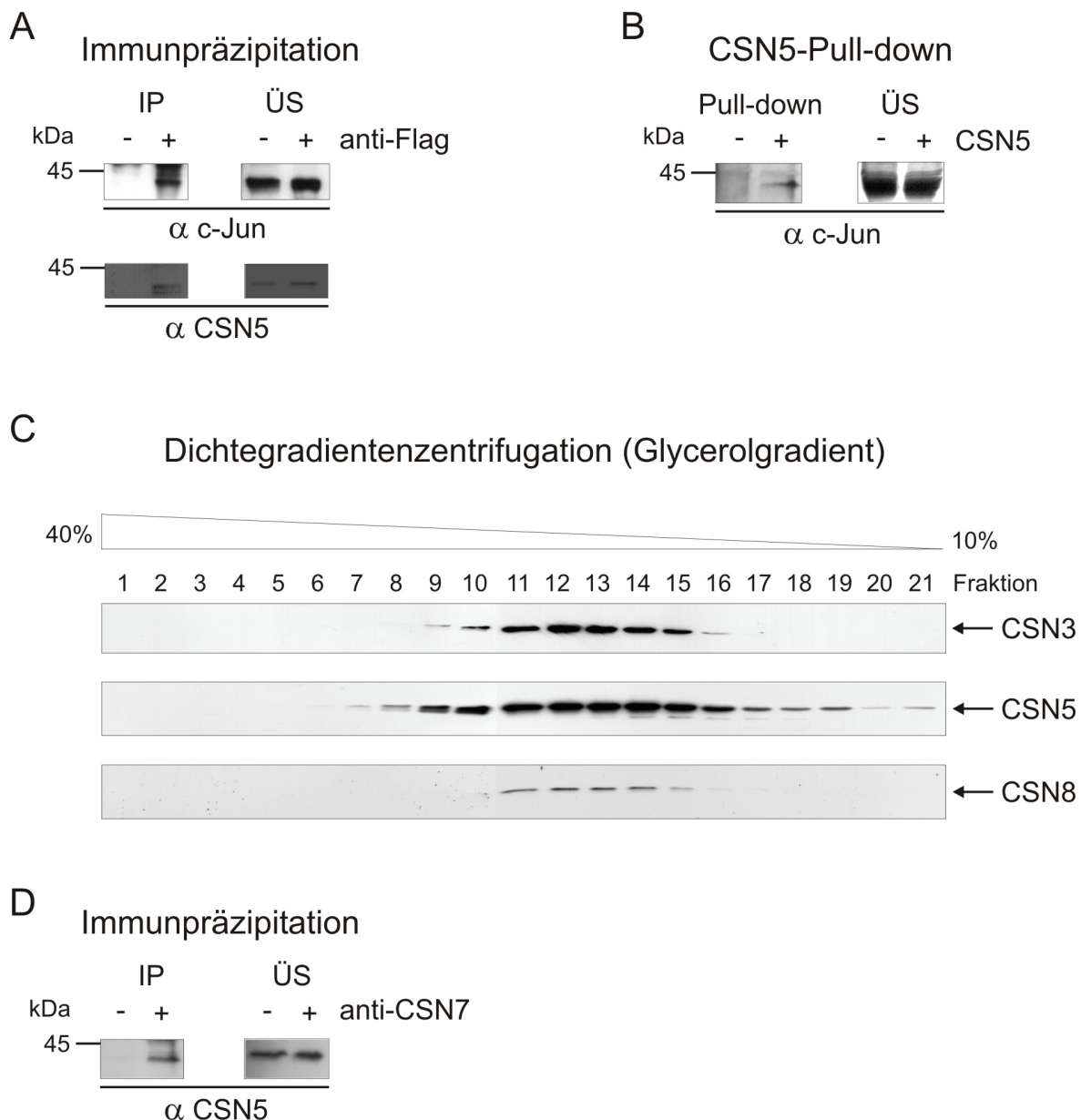


Abbildung 7: C-Jun bindet an das COP9-Signalosom. **(A)** CSN5 bindet an c-Jun. Eine Immunpräzipitation wurde mit einem anti-Flag-Antikörper und dem Lysat von HeLa-Zellen, die zuvor mit Flag-markiertem c-Jun transient transfiziert wurden, durchgeführt. Die Präzipitation von c-Jun sowie von an c-Jun gebundenem CSN5 wurde im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern (α c-Jun und α CSN5) nachgewiesen. Zur Bestätigung übereinstimmender Proteinkonzentrationen in beiden Ansätzen wurden auch die Überstände (ÜS) untersucht. **(B)** C-Jun bindet an CSN5. Mit tosylaktivierten M-280-Dynabeads[®] und His₆-markiertem, rekombinantem CSN5 gelang es, aus HeLa-Zellysat c-Jun zu präzipitieren. In den Überständen beider Ansätze zeigen sich identische Mengen an c-Jun. **(C)** CSN5 ist in HeLa-Zellen Bestandteil des CSN-Komplexes. Das Lysat von 1×10^8 HeLa-Zellen wurde in einem Glycerolgradienten (10–40%) aufgetrennt. CSN5 und zwei weitere CSN-Untereinheiten, CSN3 und CSN8, ko-migrieren mit einem Maximum in den Fraktionen 12 und 13. **(D)** In einer Immunpräzipitation konnte mit einem anti-CSN7-Antikörper im Lysat von HeLa-Zellen die Bindung von endogenem CSN5 an CSN7 gezeigt werden.

Dass CSN5 auch in HeLa-Zellen vornehmlich dem CSN-Komplexes angehört, wurde in einer Dichtegradientenzentrifugation und einer Immunpräzipitation überprüft. Das Lysat von 1×10^8 HeLa-Zellen wurde in einem Gradienten von 10–40%

Glycerol aufgetrennt. Die 21 Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen CSN3, CSN5 und CSN8 getestet. Abbildung 7C veranschaulicht, dass CSN5 und die Untereinheiten CSN3 und CSN8 ko-migrieren mit einem Maximum in den Fraktionen 12 und 13. Nur zu einem sehr geringen Teil kommt CSN5 in freier Form vor (Fraktion 20/21). Somit ist in HeLa-Zellen der Großteil des zellulären CSN5 Bestandteil des CSN-Komplexes.

Ein weiteres Indiz für die Integration von CSN5 in den CSN-Komplex ist seine Bindung an die Untereinheit CSN7. Diese Wechselwirkung konnte durch Immunpräzipitation von CSN5 mit einem anti-CSN7-Antikörper im Lysat von HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 7D).

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass c-Jun nicht nur an CSN5 bindet, sondern über diese Untereinheit auch mit dem COP9-Signalosom interagiert.

4.1.2 Curcumin induziert den Abbau und die Bildung

hochmolekularer Formen von c-Jun *in vitro*

Curcumin, ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff aus der Wurzel von *Curcuma longa* (Gelbwurzel), das als farbgebender Bestandteil des Currypulvers weite Verbreitung findet, ist ein potenter Hemmstoff der CSN-assoziierten Kinasen (Henke et al., 1999). Da diese Kinasen durch Phosphorylierung c-Jun stabilisieren, hat ihre Hemmung durch Curcumin eine Destabilisierung von c-Jun zur Folge (Haworth & Avkiran, 2001; Naumann et al., 1999).

In einem *in vitro*-Ubiquitinierungs-System sollte der Mechanismus der Regulation der Stabilität von c-Jun durch Phosphorylierung ausführlicher untersucht werden. Dazu wurde rekombinantes c-Jun zusammen mit Ubiquitin und Lysat aus HeLa-Zellen, das die ubiquitinierenden Enzyme bereitstellt, bis zu acht Stunden in An- oder Abwesenheit von 50 µM Curcumin inkubiert. Dem Kontrollansatz wurde lediglich DMSO zugegeben, um die Konzentrationen des Lösungsmittels von Curcumin anzugleichen. Nach acht Stunden Inkubation bei 37°C konnte im Western Blot in der mit Curcumin behandelten Probe eine klare Reduktion von c-Jun beobachtet werden (Abbildung 8). Im unbehandelten Ansatz war dagegen keine Verminderung von c-Jun festzustellen. Des Weiteren konnte unter Curcumineinfluss eine deutliche Induktion von hochmolekularen Formen von c-Jun nachgewiesen werden. Diese Abkömmlinge, die als HMW (high molecular weight)-c-Jun bezeichnet

wurden, unterschieden sich nicht nur quantitativ, sondern auch in ihrem Muster von denen, die in Abwesenheit von Curcumin zu detektieren waren. Eine prominente Bande unterhalb von 97 kDa fiel besonders auf. Damit entspricht sie ungefähr der doppelten Größe von c-Jun, das eine Molekulargewicht von ca. 40 kDa besitzt.

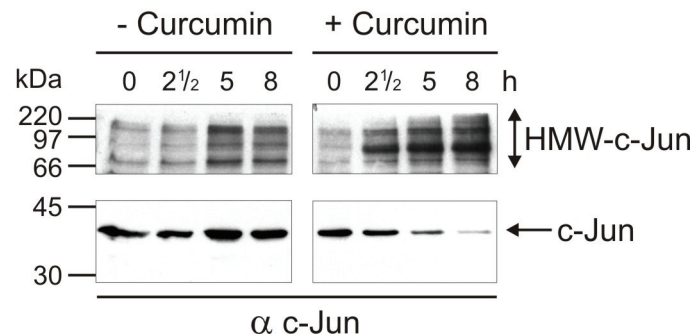


Abbildung 8: Curcumin destabilisiert c-Jun und erzeugt hochmolekulare c-Jun-Formen *in vitro*. In einem Ubiquitinierungs-Assay wurde rekombinantes c-Jun zusammen mit HeLa-Zelllysate, Ubiquitin in An- bzw. Abwesenheit von 50 µM Curcumin für acht Stunden inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen. Nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung konnten im Western Blot eine durch Curcumin induzierte Destabilisierung von c-Jun und die Bildung von HMW (high molecular weight)-c-Jun mit einem anti-c-Jun-Antikörper (α c-Jun) nachgewiesen werden. Eine Bande unterhalb von 97 kDa trat in Gegenwart von Curcumin besonders intensiv auf.

4.1.3 Curcumin fördert den Ubiquitin-abhängigen Abbau von c-Jun in HeLa-Zellen

Curcumin destabilisiert c-Jun in HeLa-Zellen (Henke et al., 1999; Pollmann et al., 2001). Um den genauen Wirkmechanismus aufzudecken, wurde der Effekt von Curcumin auf c-Jun in dem folgenden Experiment detaillierter analysiert.

HeLa-Zellen wurden dazu mit Flag-markierter c-Jun-cDNA transient transfiziert. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die c-Jun überexprimierenden Zellen mit 1, 5, 25 oder 50 µM Curcumin für weitere vier Stunden behandelt. Ein Ansatz enthielt neben 50 µM Curcumin noch 20 µM des 26S-Proteasom-Hemmstoffes MG-132. Die Zellen der Negativkontrolle erhielten lediglich DMSO, das Lösungsmittel von Curcumin und MG-132. Auch dem Medium der Ansätze, die mit weniger als 50 µM Curcumin inkubiert wurden, wurde zur Gewährleistung identischer Konzentrationen die jeweils fehlende Menge DMSO hinzugegeben. Der vierstündigen Inkubationszeit schlossen sich die Lyse der Zellen, die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE, der Proteintransfer auf Nitrozellulose im Western Blot sowie die abschließende Untersuchung der Membranen mit verschiedenen Antikörpern an.

Für die Analyse der VEGF-Konzentration (s. Abschnitt 4.1.5) wurde jeder Zellkultur vor der Lyse noch 1 ml des Überstandes entnommen.

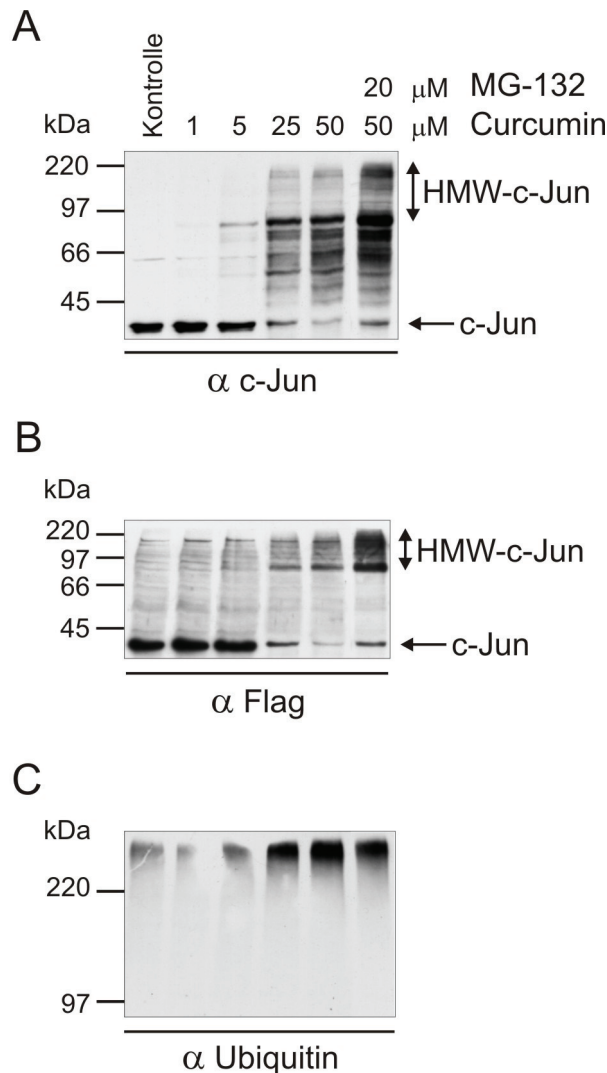


Abbildung 9: Curcumin induziert den Ubiquitin-abhängigen Abbau von c-Jun in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit Flag-markiertem c-Jun transfiziert und nach 18 Stunden für weitere vier Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Curcumin bzw. MG-132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. **(A)** Mit einem anti-c-Jun-Antikörper (α c-Jun) konnte die konzentrationsabhängige Destabilisierung von c-Jun sowie die Induktion hochmolekularer c-Jun-Formen (HMW-c-Jun) durch Curcumin sichtbar gemacht werden. Besonders prägnant erschien eine Bande in der Höhe von 97 kDa. Die kombinierte Inkubation mit 20 μ M MG-132 verstärkte diese Effekte von Curcumin noch zusätzlich. **(B)** Ein anti-Flag-Antikörper (α Flag) bestätigte dieses Ergebnis. **(C)** Durch einen anti-Ubiquitin-Antikörper (α Ubiquitin) ließ sich nach Proteinauftrennung im 8%-igen SDS-Gel im Western Blot die Bildung hochmolekularer Ubiquitin-Konjugate in Abhängigkeit der Curcumin-Konzentration zeigen.

Abbildung 9A veranschaulicht die konzentrationsabhängige Destabilisierung von c-Jun durch Curcumin. Bereits in Anwesenheit von 25 μ M Curcumin war ein deutlicher Effekt auf die Stabilität von c-Jun zu erkennen, der sich unter Einfluss von 50 μ M Curcumin noch einmal sichtbar steigerte. 5 μ M Curcumin waren dagegen

noch nicht in der Lage, c-Jun signifikant zu destabilisieren. Parallel zu diesem Rückgang der zellulären c-Jun-Spiegel ließ sich für die Bildung hochmolekularer c-Jun-Formen und für das Auftreten einer intensiven Bande unterhalb von 97 kDa ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung von Curcumin beobachten. Diese Effekte Curcumins wurden durch die kombinierte Inkubation mit MG-132 noch einmal verstärkt. Daneben schwächte MG-132 die destabilisierende Wirkung von Curcumin auf c-Jun etwas ab, was sich, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit 50 μ M Curcumin, in einer Zunahme der c-Jun-Bande wieder spiegelte.

Mit einem anti-Flag-Antikörper konnten diese Resultate verifiziert werden (Abbildung 9B). Von den hochmolekularen c-Jun-Banden reagierten im Unterschied zu dem anti-c-Jun-Antikörper nur die Banden oberhalb von 97 kDa spezifisch mit dem anti-Flag-Antikörper. Die zuvor beschriebene Bande im Bereich von 97 kDa stellte sich auch mit diesem Antikörper sehr ausgeprägt dar. Dass die zusätzliche Behandlung der Zellen mit MG-132 die Bildung von HMW-c-Jun durch Curcumin intensiviert, konnte ebenso gezeigt werden.

Um die Vermutung zu prüfen, dass es sich bei den hochmolekularen Formen von c-Jun um Konjugate von c-Jun mit Ubiquitin handelt, wurden die gleichen Proben in einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper analysiert. Dabei ließen sich mit steigender Curcumin-Konzentration vermehrt langkettige Ubiquitin-Konjugate jenseits von 220 kDa detektieren (Abbildung 9C). Dies unterstützt die These, dass Curcumin über die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen eine vermehrte Ubiquitinierung von c-Jun induziert und auf diesem Weg seinen Abbau über das 26S-Proteasom initiiert.

Das nächste Experiment verfolgte das Ziel, die Reversibilität der Wirkung von Curcumin auf c-Jun zu überprüfen. Im ersten Schritt wurden HeLa-Zellen mit Flag-markierter c-Jun-cDNA transfiziert und 18 Stunden inkubiert. Daran schloss sich die nur einstündige Behandlung der Zellen mit 50 μ M Curcumin an. Nach Ablauf dieser Stunde wurde das Medium gewechselt. Das neue Medium enthielt entweder 20 μ M MG-132 oder lediglich DMSO. Daraufhin wurden die Zellen weitere sechs Stunden inkubiert. Der Lyse der Zellen zu den in Abbildung 10 angegebenen Zeiten folgten die elektrophoretische Proteinseparation, der Transfer im Western Blot und die Immundetektion mit den aufgeführten Antikörpern.

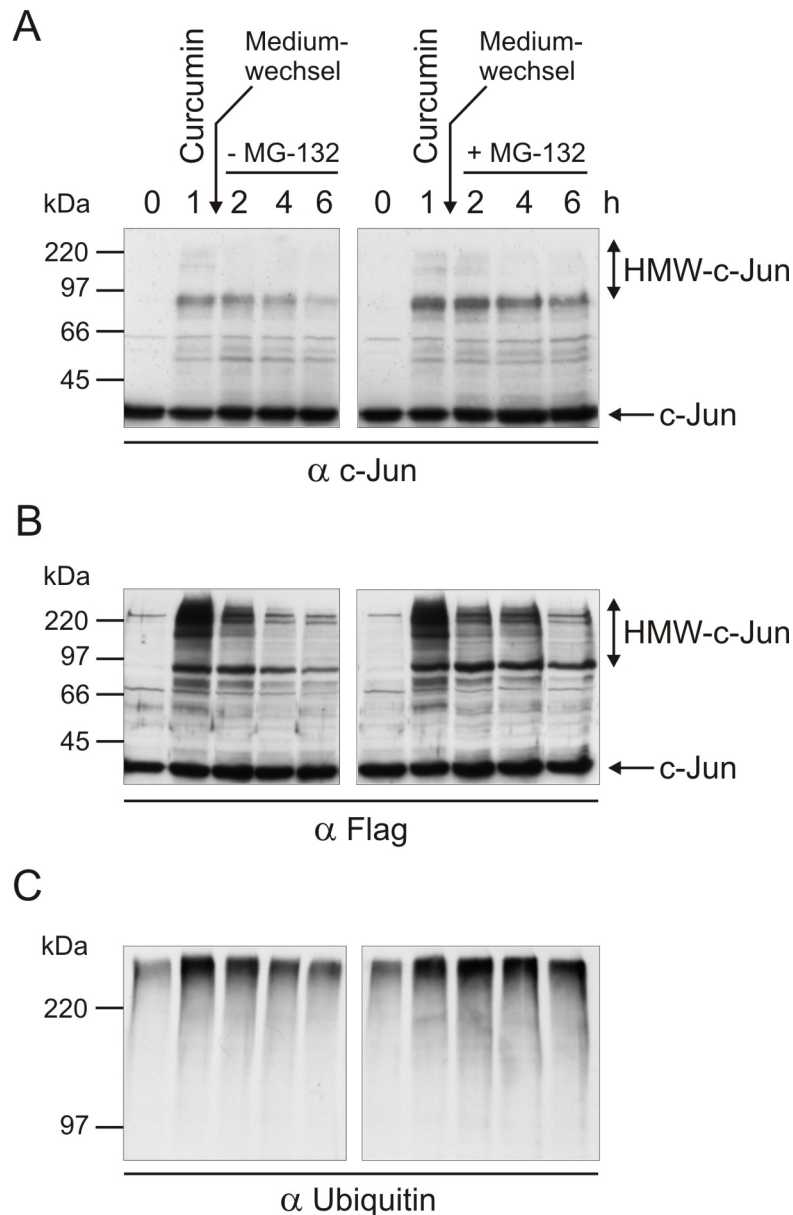


Abbildung 10: Die Wirkung von Curcumin auf c-Jun in HeLa-Zellen ist reversibel. HeLa-Zellen wurden mit Flag-markierter c-Jun-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) transient transfiziert. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die Zellen eine Stunde mit 50 μ M Curcumin behandelt. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit oder ohne 20 μ M MG-132 für weitere sechs Stunden inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Lyse der Zellen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. **(A)** Die Untersuchung der Membranen mit einem anti-c-Jun-Antikörper (α c-Jun) veranschaulicht die Induktion hochmolekularer c-Jun-Formen (HMW-c-Jun) durch Curcumin sowie ihren verlangsamten Rückgang unter Einfluss von MG-132. Wieder stellte sich eine Bande in der Höhe von 97 kDa sehr intensiv dar. **(B)** Etwas deutlicher noch konnten das Auftreten und die zeitabhängige Abnahme von HMW-c-Jun mit einem anti-Flag-Antikörper (α Flag) wiedergegeben werden. **(C)** Ein anti-Ubiquitin-Antikörper (α Ubiquitin) ließ ein zu HMW-c-Jun analoges Verhalten von langkettigen Ubiquitin-Konjugaten erkennen.

Abbildung 10A, die die Detektion mit einem anti-c-Jun-Antikörper wiedergibt, zeigt, dass Curcumin nach nur einer Stunde c-Jun zwar nicht nennenswert destabilisieren kann, dafür aber in der Lage ist, hochmolekulare Formen von c-Jun zu induzieren. Diese c-Jun-Formen, unter denen eine kräftige Bande im Bereich von 97 kDa wieder besonders auffällt, verschwinden in den folgenden sechs Stunden

ohne Curcumineinwirkung nahezu vollständig. Ihr Rückgang kann jedoch durch MG-132 merklich verlangsamt werden.

Noch klarer konnte dieser Sachverhalt mit einem anti-Flag-Antikörper verdeutlicht werden (Abbildung 10B). Neben den hochmolekularen c-Jun-Abkömmlingen stellte sich wieder eine Bande in der Region von 97 kDa sehr intensiv dar. An ihr ist der verzögerte Abbau der hochmolekularen Formen von c-Jun in Gegenwart von MG-132 sehr gut zu beobachten.

Dass es sich bei den hochmolekularen Formen höchstwahrscheinlich um Ubiquitin-Konjugate von c-Jun handelt, ließ sich aus dem Bindungsmuster des anti-Ubiquitin-Antikörpers schließen (Abbildung 10C). Schon nach der einstündigen Behandlung der Zellen mit 50 μ M Curcumin entstanden in großem Umfang Ubiquitin-Konjugate, die, ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in der 8%-igen SDS-PAGE zufolge, sehr langkettig sein müssen. Auch diese Konjugate ließen sich genau wie die hochmolekularen c-Jun-Formen durch die Zugabe von MG-132 effektiv stabilisieren. Dagegen erfolgte in Abwesenheit von MG-132 innerhalb von sechs Stunden eine Rückbildung der Ubiquitin-Konjugate auf das Ausgangsniveau.

4.1.4 Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Abbau und die Ubiquitinierung von c-Jun

In Kinase-Assays konnte beobachtet werden, dass sowohl die CK2 als auch die PKD c-Jun *in vitro* phosphorylieren (Uhle et al., 2003). Diese Phosphorylierung führt zu einer Stabilisierung von c-Jun (Henke et al., 1999; Naumann et al., 1999). Deshalb sollte eine Hemmung der CK2 und der PKD einen beschleunigten Abbau von c-Jun zur Folge haben. Neben Curcumin sind auch DRB und Emodin (Battistutta et al., 2000; Zandomeni, 1989) als Hemmstoffe der CK2 und Resveratrol als Inhibitor der PKD (Haworth & Avkiran, 2001) beschrieben worden. Um die Wirkung dieser Inhibitoren auf c-Jun in einem zellulären Milieu zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen, die nach vorangegangener Transfektion Flag-markiertes c-Jun überexprimierten, für vier Stunden mit 50 μ M Curcumin, 200 μ M DRB, 200 μ M Emodin oder 100 μ M Resveratrol behandelt. Zur Hemmung des 26S-Proteasoms wurden 20 μ M MG-132 allein oder in Kombination mit einem der Kinase-Inhibitoren eingesetzt. Die Konzentration von DMSO, dem Lösungsmittel aller Hemmstoffe, wurde in jedem Ansatz auf 0,25% (v/v) eingestellt. Unmittelbar

nach Beendigung der vierstündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert. Jeder Kulturschale wurde zuvor noch 1 ml des Überstandes zur Analyse der VEGF-Konzentration (s. Abschnitt 4.1.5) entnommen. Der Zellyse folgten die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE, ihr Transfer auf Nitrozellulose mittels Western Blot und im letzten Schritt die immunologische Proteindetektion.

Mit Hilfe eines anti-c-Jun-Antikörpers konnte demonstriert werden, dass alle vier eingesetzten Kinase-Hemmstoffe c-Jun in HeLa-Zellen destabilisieren (Abbildung 11A). Besonders effektiv zeigten sich in dieser Hinsicht Curcumin und Emodin. Curcumin bewirkte auch eine signifikante Akkumulation hochmolekularer Formen von c-Jun (HMW-c-Jun). Unter ihnen fiel erneut eine stark reagierende Bande im Bereich von 97 kDa auf. Dagegen stabilisierte MG-132 c-Jun. Auch in kombinierter Anwendung mit einem der Kinase-Inhibitoren konnte die destabilisierende Wirkung dieser Substanzen auf c-Jun reduziert werden.

Das gleiche Resultat lieferte die Analyse der Membranen mit einem anti-Flag-Antikörper (Abbildung 11B). Abermals waren eine Destabilisierung von c-Jun durch alle Kinase-Inhibitoren und seine Stabilisierung in Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG-132 nachzuweisen. Die Induktion hochmolekularer Formen von c-Jun durch Curcumin und die verstärkte Bildung dieser c-Jun-Abkömmlinge in Gegenwart von MG-132 konnten ebenfalls mit diesem Antikörper bestätigt werden.

Die elektrophoretische Auftrennung der zellulären Proteine in einem 8%-igen SDS-Gel, der darauffolgende Western Blot und die abschließende immunologische Proteindetektion mittels anti-Ubiquitin-Antikörper ergaben, dass im Zuge der vierstündigen Inkubation mit Curcumin begleitend zu den hochmolekularen c-Jun-Formen auch vermehrt langkettige Ubiquitin-Konjugate in den Zellen gebildet wurden (Abbildung 11C). Ein solches Ergebnis steht in Einklang mit der zuvor geäußerten Vermutung, dass die hochmolekularen Formen von c-Jun und die gleichzeitig entstehenden Ubiquitin-Konjugate in Wahrheit ein und dasselbe Substrat, nämlich langkettige c-Jun-Ubiquitin-Konjugate, repräsentieren. Dass auch MG-132 eine Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten bewirkte, war aufgrund der durch diese Substanz hervorgerufenen Blockade des 26S-Proteasoms zu erwarten.

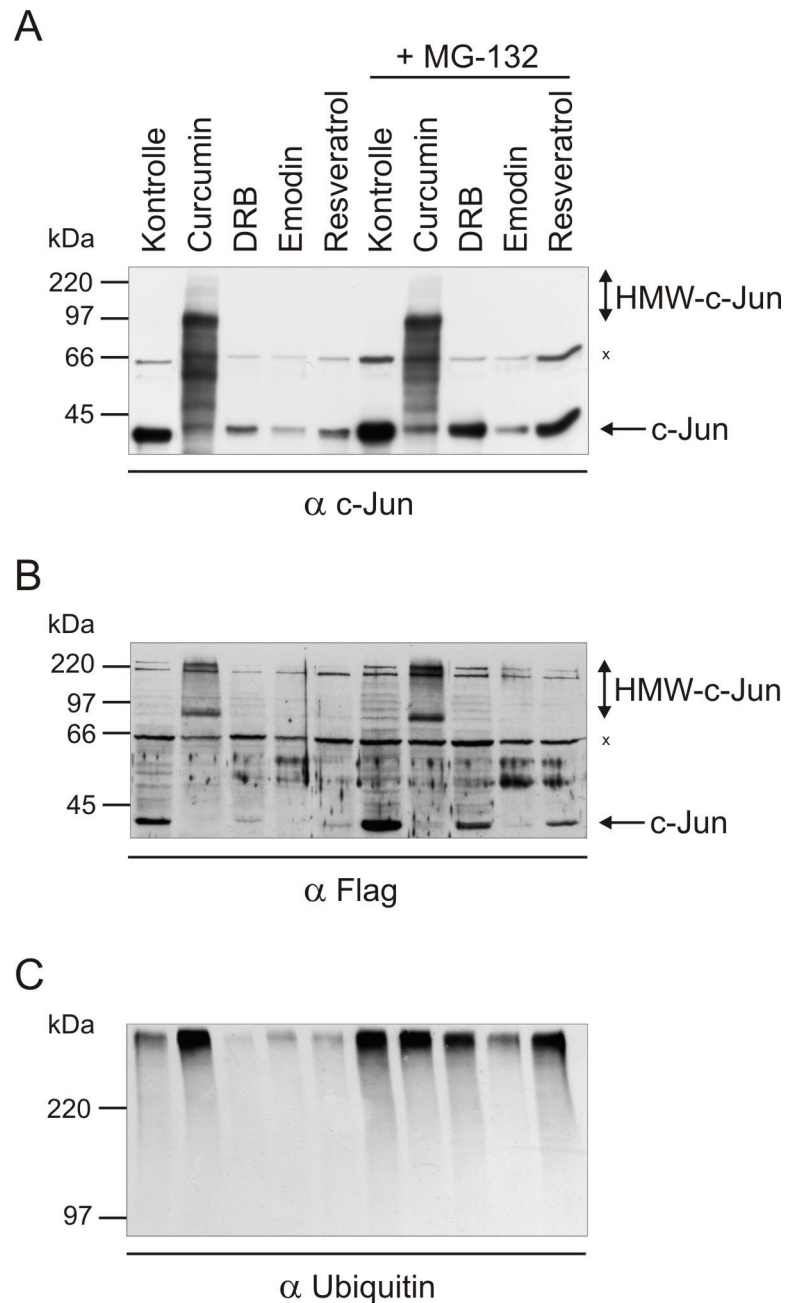


Abbildung 11: Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Abbau von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System. HeLa-Zellen, die transient mit Flag-markierter c-Jun-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) transfiziert wurden, wurden 18 Stunden nach der Transfektion mit 50 μ M Curcumin, 200 μ M DRB, 200 μ M Emodin, 100 μ M Resveratrol oder 20 μ M MG-132 behandelt. Nach vier Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen Antikörpern analysiert. **(A)** Die Untersuchung mit einem anti-c-Jun-Antikörper (α c-Jun) ergab, dass die Kinase-Inhibitoren c-Jun destabilisieren. Dagegen stabilisiert MG-132 c-Jun. Curcumin induziert hochmolekulare c-Jun-Formen (HMW-c-Jun). (x = unbekannte Reaktivität des Antikörpers auf Höhe von 66 kDa) **(B)** Mit einem anti-Flag-Antikörper (α Flag) konnten diese Resultate bestätigt werden. **(C)** Die gleichen Proben wurden in einem 8%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper (α Ubiquitin) getestet. Die Behandlung mit Curcumin oder MG-132 führte zu einer verstärkten Bildung von langkettigen Ubiquitin-Konjugaten.

4.1.5 Hemmstoffe der CK2 und PKD reduzieren die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen

In früheren Studien konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität des COP9-Signalosom nicht nur an der Stabilisierung von c-Jun beteiligt ist, sondern auch die von diesem Transkriptionsfaktor regulierte Produktion von VEGF, dem bedeutendsten angiogenen Wachstumsfaktor (s. Abschnitt 1.2), beeinflusst (Pollmann et al., 2001). Daher bewirkt die Hemmung der Phosphorylierung von c-Jun durch Curcumin neben der Destabilisierung von c-Jun selbst auch eine Reduktion der Synthese von VEGF. Bisher war nur bekannt, dass Curcumin in HeLa-Zellen die VEGF-Produktion proportional zu seiner Einwirkungszeit supprimiert (Pollmann et al., 2001).

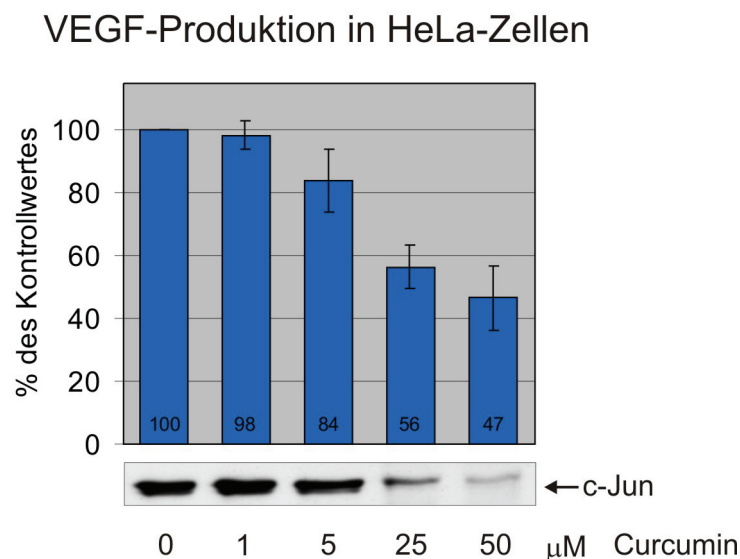


Abbildung 12: Curcumin supprimiert die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen konzentrationsabhängig. In dem in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Experiment wurde parallel zu c-Jun auch die VEGF-Konzentration in den Zellüberständen gemessen. Nach der Inkubation der Zellen mit den angegebenen Curcumin-Molaritäten für vier Stunden wurde jedem Ansatz 1 ml Überstand entnommen. Mit einem ELISA wurde darin die VEGF-Konzentration bestimmt. Die einzelnen Konzentrationen wurden zu dem Wert der unbehandelten Kontrolle (=100%) ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung wurden in einem Säulendiagramm wiedergegeben. Zusätzlich wurde die einer jeden Curcumin-Konzentration entsprechenden c-Jun-Bande angegeben. Dafür wurde ein vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 9 gewählt.

In dem Versuch, wie er in Abschnitt 4.1.3 dargestellt ist (Abbildung 9), wurde neben dem zellulären c-Jun-Spiegel die VEGF-Produktion in Abhängigkeit der verschiedenen Curcumin-Konzentrationen gemessen. Abbildung 12 verdeutlicht, dass eine ähnliche Relation auch zwischen der Konzentration von Curcumin und der Repression der VEGF-Synthese besteht. Nach vierstündiger Behandlung mit

Curcumin sank die VEGF-Konzentration im Zellüberstand in Abhängigkeit der eingesetzten Curcumin-Molarität. Waren die Effekte von 1 und 5 μM noch marginal, so reduzierten 25 μM Curcumin die VEGF-Produktion bereits auf 56% des Kontrollwertes. 50 μM Curcumin ließen die VEGF-Konzentration sogar auf 47% absinken.

Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch die anderen Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen zusätzlich zu ihrer destabilisierenden Wirkung auf c-Jun einen vergleichbaren Effekt auf die VEGF-Produktion haben. Dazu wurde in dem Experiment, das in Abschnitt 4.1.4 beschrieben wurde, unmittelbar vor der Lyse der Zellen 1 ml des zellfreien Mediumüberstandes entnommen. In den Überständen, die während der achtmaligen Durchführung dieses Experiments gewonnen werden konnten, wurden mit einem ELISA die VEGF-Konzentrationen bestimmt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zellzahlen, die in den einzelnen Versuchen zum Einsatz kamen, wurden die VEGF-Konzentrationen der Hemmstoff-behandelten Proben jeweils zu dem Wert des unbehandelten Ansatzes in Relation gesetzt. Die VEGF-Konzentration der unbehandelten Kontrolle wurde als 100% definiert. Für jeden Hemmstoff wurden die acht Prozentwerte gemittelt und zusammen mit ihrer Standardabweichung in einem Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 13). Die Signifikanz der Abweichung vom Kontrollwert wurde für alle Hemmstoffe mit einem t-Test für verbundene Stichproben überprüft. Das Signifikanzniveau war stets kleiner als 0,01. Daneben wurde noch der einem jeden Hemmstoff entsprechende c-Jun-Spiegel angegeben. Stellvertretend wurde dafür ein vergrößerter Ausschnitt der c-Jun-Bande aus Abbildung 11A gewählt.

Abbildung 13 lässt erkennen, dass alle getesteten Inhibitoren der CK2 und PKD begleitend zu der Destabilisierung von c-Jun auch die Produktion von VEGF auf 53–71% des Kontrollwertes reduzierten. Am potentesten wirkten Emodin (53%) und Curcumin (55%). Auch der CK2-Hemmstoff DRB senkte die VEGF-Konzentration auf 57% des Wertes, der in der unbehandelten Proben bestimmt werden konnte. Dagegen war Resveratrol, ein Inhibitor der PKD, mit 71% deutlich schwächer wirksam. Der 26S-Proteasom-Hemmstoff MG-132 verminderte ebenfalls die VEGF-Konzentration, obwohl er im Gegensatz zu den Kinase-Inhibitoren c-Jun stabilisierte. Ebenso reduzierte die Kombination aus MG-132 und einem Kinase-Hemmstoff die VEGF-Synthese deutlich effektiver als die alleinige Behandlung mit dem Kinase-Hemmstoff, obgleich die Stabilität von c-Jun durch die zusätzliche Inkubation mit MG-132 erhöht wurde. Dieser Kombinationseffekt beider

Substanzen entspricht ungefähr dem Produkt aus den beiden Einzelwerten. Beispielsweise verringerten Curcumin und MG-132 in der Einzelanwendung die VEGF-Konzentration auf 55 bzw. 70%. Das Produkt dieser beiden Werte beträgt 38,5% und liegt somit unweit der gemessenen 41%.

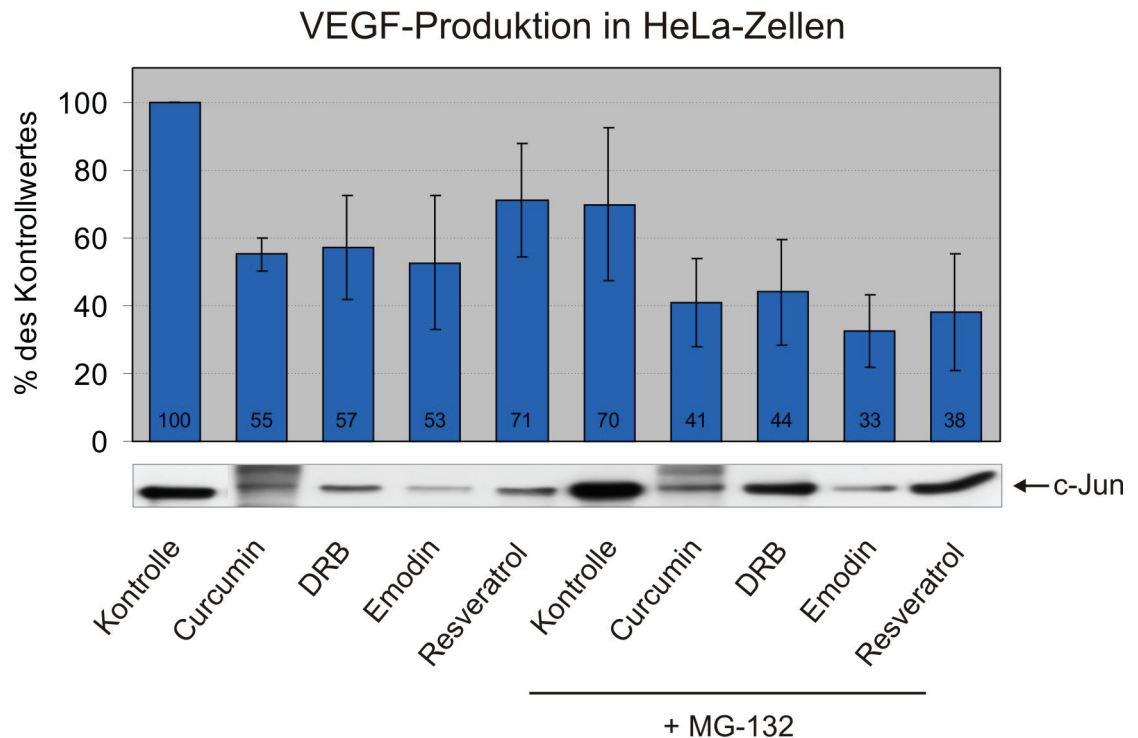


Abbildung 13: Inhibitoren der CK2 und PKD reduzieren die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen. Es wurden acht Experimente nach dem Schema, wie es in Abschnitt 4.1.4 beschrieben und in Abbildung 11 veranschaulicht wurde, durchgeführt. Unmittelbar vor der Lyse der Zellen wurde jeweils 1 ml Überstand entnommen und bei -70°C eingefroren. Mit einem ELISA wurde die VEGF-Konzentration in jedem Überstand der acht unabhängigen Experimente bestimmt. Die einzelnen Konzentrationen wurden zu dem Wert der unbehandelten Kontrolle (=100%) ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden errechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt. Ebenso wurde nochmals die jedem Hemmstoff entsprechende c-Jun-Bande aus Abbildung 11A angegeben. Unter Annahme einer Normalverteilung wurde mit einem t-Test für verbundene Stichproben die Signifikanz überprüft. Alle Inhibitoren, einschließlich MG-132, verminderten signifikant die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen. Die Kombination von MG-132 und einem der Kinase-Hemmstoffe zeigte diesbezüglich die größte Wirksamkeit.

4.2 Regulation des Ubiquitin-abhängigen Abbaus von Id1 und Id3 durch das COP9-Signalosom

4.2.1 Id3 bindet an das COP9-Signalosom

Nachdem Bounpheng und Christy zuvor gezeigt hatten, dass die Id-Proteine durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System abgebaut werden (Bounpheng et al, 1999), entdeckten sie bei ihrer Suche nach weiteren Bindungspartnern, dass Id3 in einer Two-hybrid-Analyse in Hefezellen möglicherweise mit CSN5 interagiert. Diese Untereinheit des COP9-Signalosoms bildet die zentrale Bindungsstelle für die meisten vom CSN-Komplex regulierten Substrate (Bech-Otschir et al., 2002). In einer weiteren Two-hybrid-Untersuchung in 293-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, bestätigte sich nicht nur die Bindung von Id3 an CSN5, sondern auch für Id1 konnte eine solche Wechselwirkung mit CSN5 nachgewiesen werden, nicht dagegen aber für Id2 oder Id4 (Berse et al., 2004).

Da CSN5 in Two-hybrid-Assays falsch-positive Ergebnisse liefern kann (Nordgard et al., 2001), wurden zur Bestätigung der Interaktion zwischen Id3 und CSN5 Far-Western Blot-Analysen (Filterbindungs-Assays) und Glutathion-S-Transferase (GST)-Pull-down-Experimente durchgeführt. Für die Far-Western Blots wurden die auf Nitrozellulose immobilisierten Untereinheiten CSN5, CSN6 und CSN7 eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen mit rekombinantem GST-Id3 inkubiert und mit einem anti-GST-Antikörper untersucht. Abbildung 14A zeigt, dass GST-Id3 an CSN5 bindet. Zusätzlich konnte auch eine Interaktion mit CSN7 festgestellt werden.

In den Pull-down-Experimenten wurden GST und GST-Id3 an eine Glutathion-Agarose-Säule gebunden und mit His₆-markiertem CSN5 oder CSN7 inkubiert. Nach dem Waschen der Säule und der Ablösung der an ihr heftenden Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-His-Antikörper identifiziert. Auch in diesem Versuch ließ sich eine Bindung von GST-Id3 an CSN5 und CSN7 beobachten. Die unspezifische Wechselwirkung beider Untereinheiten mit GST war dagegen nur schwach (Abbildung 14B, linke Spalte).

Um auch die Interaktion von Id3 mit dem gesamten COP9-Signalosom zu beweisen, wurde in einer ähnlichen Untersuchung statt der Untereinheiten der aufgereinigte CSN-Komplex eingesetzt. Im immunologischen Proteinnachweis mit

einem anti-CSN5-Antikörper war eine deutliche Bindung des Komplexes an GST-Id3 zu detektieren (Abbildung 14B, rechte Spalte).

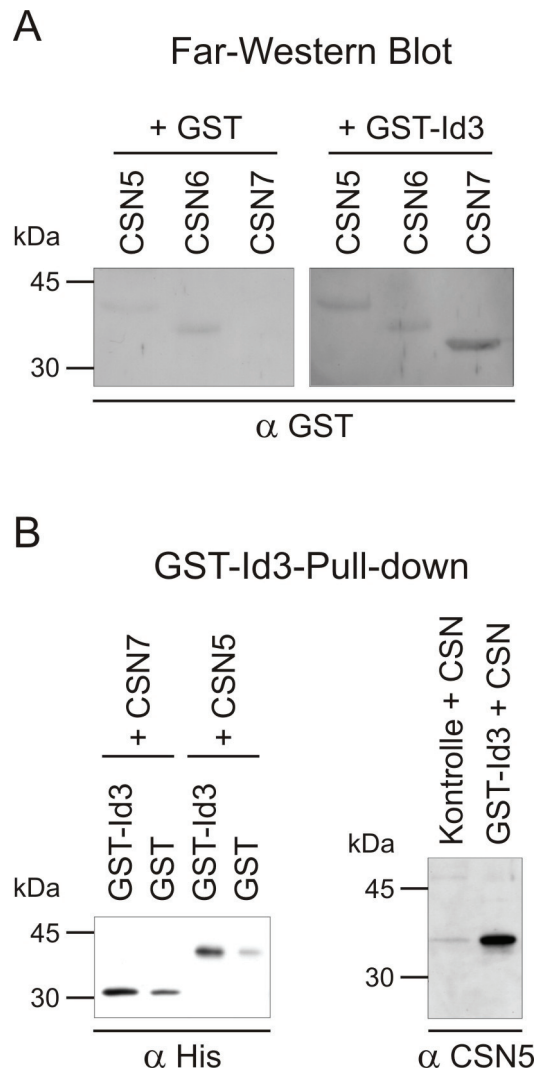


Abbildung 14: Interaktion von Id3 mit CSN5, CSN7 und dem CSN-Komplex. **(A)** Far-Western Blot-Experimente wurden mit den rekombinanten Untereinheiten CSN5, CSN6 und CSN7, die auf Nitrozellulose immobilisiert worden waren, durchgeführt. Die Membranen wurden mit GST oder GST-Id3 inkubiert und mit einem anti-GST-Antikörper (α GST) untersucht. GST-Id3 bindet an CSN5 und CSN7. Die Interaktion zwischen GST und den Untereinheiten war dagegen nur schwach. **(B)** Für die Pull-down-Experimente wurden an Glutathion-Agarose gebundenes GST-Id3 oder GST (als Kontrolle) eingesetzt. His₆-markiertes CSN5 und CSN7 (linke Spalte) oder der aufgereinigte CSN-Komplex (rechte Spalte) wurden dazugegeben. Die Western Blots wurden mit anti-His (α His)- oder anti-CSN5 (α CSN5)-Antikörpern untersucht. Wiederum zeigte sich eine Bindung von GST-Id3 an CSN5 und CSN7 sowie an den CSN-Komplex.

4.2.2 Id3 hemmt die CSN-abhängige Phosphorylierung

In vielen Fällen wird ein Protein, das an das COP9-Signalosom bindet, auch von den Kinasen, die mit dem Komplex assoziiert sind, phosphoryliert (Bech-Otschir et al., 2002; Uhle et al., 2003). Deshalb wurde in einem Kinase-Assay untersucht, ob der gereinigte CSN-Komplex oder die mit ihm verknüpften Kinasen CK2 und PKD

in der Lage sind, rekombinantes GST-Id3 zu phosphorylieren. Überraschenderweise konnte dabei, wie in Abbildung 15A dargestellt, weder für den Komplex noch für die rekombinanten Kinasen eine Phosphorylierung von GST-Id3 nachgewiesen werden. Allerdings war zu beobachten, dass GST-Id3 die Phosphorylierung von c-Jun hemmt. Besonders die Phosphorylierung durch den CSN-Komplex und die CK2 wurden in Gegenwart von GST-Id3 deutlich reduziert. Die durch die PKD bewirkte Phosphorylierung wurde dagegen bei weitaus geringerem Ausgangsniveau nicht vermindert. Außerdem ist aus Abbildung 15A ersichtlich, dass die Phosphorylierung der zweiten Untereinheit des CSN-Komplexes (CSN2) durch die assoziierten Kinasen nach Zugabe von GST-Id3 ebenfalls vermindert wurde.

Abbildung 15B zeigt, dass in einem Kinase-Assay auch die Phosphorylierung von ICSBP (interferon consensus sequence-binding protein), das über CSN2 an das COP9-Signalosom bindet (Cohen et al., 2000), durch Id3 sichtlich abgeschwächt wird.

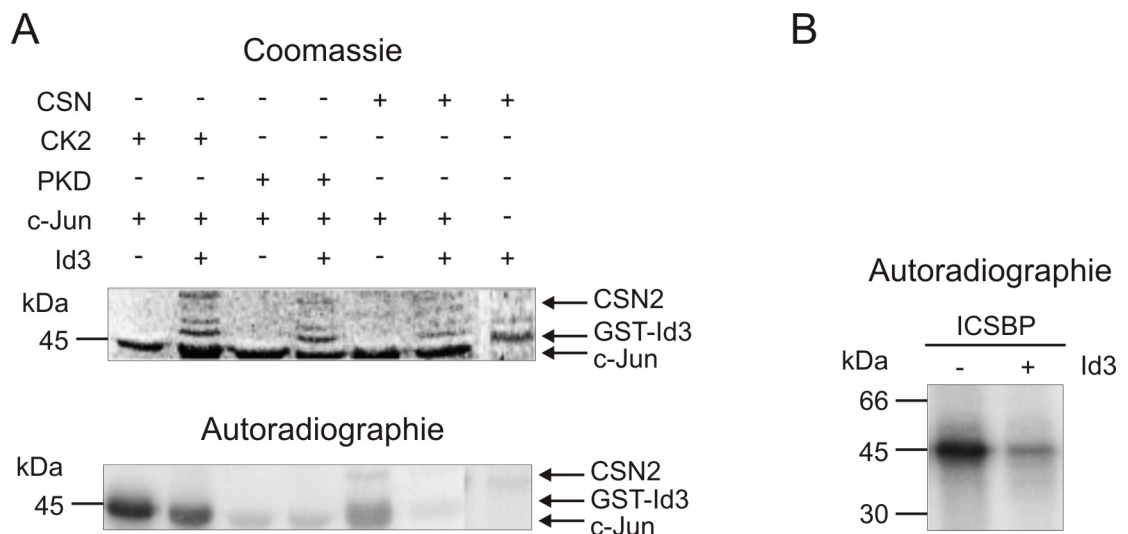


Abbildung 15: Id3 inhibiert die Phosphorylierung von c-Jun durch das COP9-Signalosom. **(A)** Kinase-Assays wurden, wie unter 3.2.22 beschrieben, mit dem gereinigten CSN-Komplex oder den rekombinanten Kinasen CK2 und PKD sowie rekombinatem c-Jun und GST-Id3 als Substrate durchgeführt. Id3 reduziert signifikant die Phosphorylierung von c-Jun und CSN2 durch den aufgereinigten CSN-Komplex. Die Phosphorylierung durch CK2 war empfindlicher gegenüber Id3 als die durch PKD. **(B)** Auch in einem Kinase-Assay mit gereinigtem CSN-Komplex, dem rekombinantes ICSBP als Substrat zugefügt wurde, hemmte GST-Id3 die Phosphorylierung des Substratproteins.

4.2.3 Curcumin induziert hochmolekulare Formen von Id3 *in vitro*

Der Ubiquitin-abhängige Abbau von c-Jun über das 26S-Proteasom wird durch Curcumin beschleunigt (s. Abschnitt 4.1.2–4.1.4; Henke et al., 1999;

Pollmann et al., 2001). Obwohl nach den bisherigen Ergebnissen Id3 kein Substrat der CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD ist, wurde der Effekt von Curcumin auf Id3 in einem *in vitro*-Ubiquitinierungs-System getestet. Hierzu wurde ein Ubiquitinierungs-Assay, wie er bereits für c-Jun beschrieben wurde (s. Abschnitt 4.1.2), in analoger Weise durchgeführt. Lediglich das rekombinante c-Jun wurde durch GST-markiertes Id3 ersetzt. Wiederum wurde ein Ansatz mit 50 μ M Curcumin inkubiert, dem zweiten wurde lediglich DMSO in gleicher Endkonzentration zugegeben. Bereits nach vier Stunden waren nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE im Western Blot sowohl mit einem anti-Id3-Antikörper als auch mit einem anti-GST-Antikörper deutlich hochmolekulare Formen von Id3 (HMW-Id3) zu erkennen (Abbildung 16). Die GST-Id3 repräsentierende Bande nahm weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Curcumin ab.

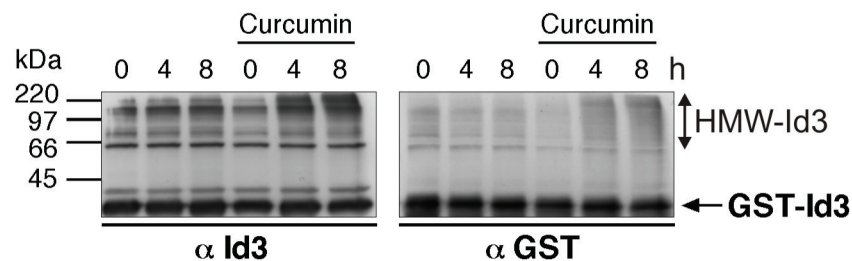


Abbildung 16: Curcumin induziert hochmolekulare Formen von Id3 *in vitro*. Rekombinantes GST-Id3 wurde mit dem Lysat von HeLa-Zellen, Ubiquitin und mit oder ohne 50 μ M Curcumin für acht Stunden inkubiert. Die Bildung von HMW (high molecular weight)-Id3 wurde im Western Blot mit einem anti-Id3 (α Id3)- und einem anti-GST (α GST)-Antikörper nachgewiesen.

4.2.4 Curcumin destabilisiert Id3 in HeLa-Zellen und erzeugt HMW-Id3

Um die Wirkung von Curcumin auf Id3 in einem zellulären Umfeld zu untersuchen, wurde Id3 in HeLa-Zellen überexprimiert. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die Zellen für weitere sechs Stunden mit 50 μ M Curcumin, 20 μ M MG-132 oder beiden Hemmstoffen behandelt. Innerhalb dieser sechs Stunden konnte auch in HeLa-Zellen eine Induktion von hochmolekularen Formen von Id3 beobachtet werden (Abbildung 17, linke Spalte). Ferner fiel eine besonders prominente Bande unterhalb von 30 kDa auf, die in Analogie zu c-Jun (s. Abschnitt 4.1.2) ungefähr dem doppelten Molekulargewicht von Id3 entspricht. Daneben war auch eine Destabilisierung von Id3 durch Curcumin zu erkennen. Die zusätzliche Inkubation mit MG-132 bewirkte eine verstärkte Ansammlung der hochmolekularen Id3-Formen (Abbildung 17, mittlere Spalte). Außerdem wurde das unmodifizierte Id3 stabilisiert. HeLa-Zellen, denen nur MG-132 zugegeben wurde, bildeten

vergleichsweise geringe Mengen dieser hochmolekularen Abkömmlinge von Id3 (Abbildung 17, rechte Spalte). In Einklang mit dem bekannten Fakt, dass Id3 durch das 26S-Proteasom abgebaut wird (Bounpheng et al., 1999), war unter der alleinigen Behandlung mit MG-132 die Zunahme des nicht modifizierten Id3s am deutlichsten.

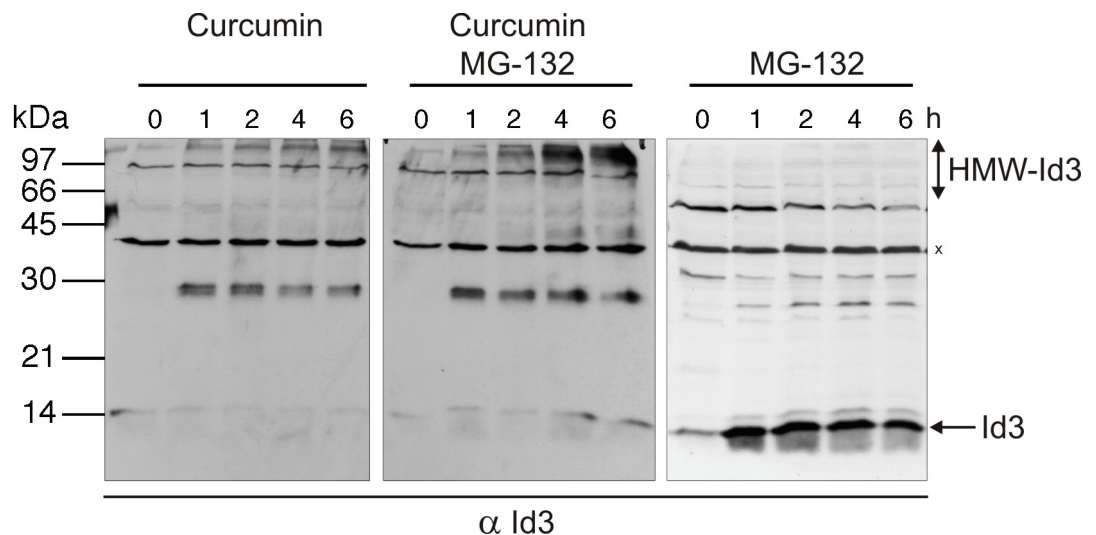


Abbildung 17: Curcumin induziert hochmolekulare Formen von Id3 in HeLa-Zellen. Id3 wurde in einem pcDNA3.1-Vektor transient in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen für weitere 1–6 Stunden mit 50 μ M Curcumin, 20 μ M MG-132 oder beiden Hemmstoffen behandelt. Die Bildung von HMW (high molecular weight)-Id3 wurde im Western Blot mit einem anti-Id3-Antikörper (α Id3) nachgewiesen. Diese bildeten sich in Anwesenheit von Curcumin. Zusätzlich erschien in Gegenwart von Curcumin eine sehr deutliche, einer Größe von etwas weniger als 30 kDa entsprechende Bande. Noch klarer waren diese Effekte bei zusätzlicher Inkubation mit MG-132 zu erkennen. Der alleinige Einsatz von MG-132 stabilisierte Id3, ohne nennenswert HMW-Id3 zu erzeugen. (x = unbekannte Reaktivität des Antikörpers zwischen 30 und 45 kDa, dient gleichzeitig als Ladekontrolle)

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Effekte von Curcumin und MG-132 auf Id3 reversibel sind. Id3 wurde zu diesem Zweck abermals in HeLa-Zellen überexprimiert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden dem Zellmedium für nur eine Stunde 50 μ M Curcumin oder 20 μ M MG-132 zugegeben. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden ohne Zusatz von Curcumin bzw. MG-132 für weitere sechs Stunden inkubiert. Im Rahmen dieser Versuchsanordnung war es möglich zu untersuchen, ob sich die unter der einstündigen Hemmstoffbehandlung eintretenden Veränderungen im Zeitverlauf wieder normalisieren. Nach der Lyse der Zellen und der Proteinseparation in der SDS-PAGE konnte im Western Blot mit einem anti-Id3-Antikörper tatsächlich die Reversibilität der Wirkungen von Curcumin und MG-132 auf Id3 gezeigt werden. Abbildung 18 veranschaulicht, dass Curcumin bereits

nach einer Stunde Id3 erkennbar destabilisierte und, was sich allerdings nur schwach darstellt, auch hochmolekulare Formen von Id3 induzierte. Wiederum war eine Bande unmittelbar unterhalb 30 kDa sehr auffällig. Diese Effekte gingen in den folgenden sechs Stunden ohne Curcumineinwirkung wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Auch die durch MG-132 erzeugte Stabilisierung von Id3 war nach sechs Stunden wieder vollständig regredient.

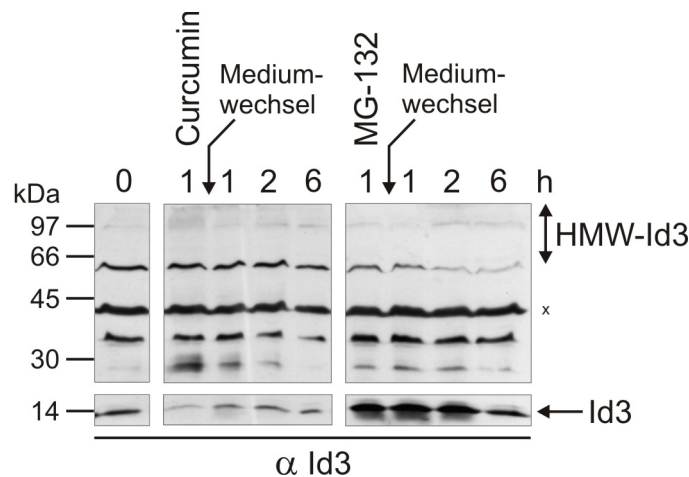


Abbildung 18: Die Wirkung von Curcumin und MG-132 auf Id3 ist reversibel. HeLa-Zellen wurden mit Id3-cDNA transient transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für nur eine Stunde entweder mit 50 μ M Curcumin oder mit 20 μ M MG-132 behandelt. Nach dem Wechsel des Mediums wurden die Zellen für weitere sechs Stunden ohne die jeweiligen Hemmstoffe inkubiert. Im Western Blot konnten mit einem anti-Id3-Antikörper (α Id3) nach einer Stunde Curcuminbehandlung eine Destabilisierung und HMW (high molecular weight)-Formen von Id3 detektiert werden. Eine Bande direkt unterhalb 30 kDa fiel besonders auf. Der 26S-Proteasom-Inhibitor MG-132 stabilisierte dagegen Id3. All diese Effekte normalisierten sich innerhalb der folgenden sechs Stunden ohne Hemmstoffzugabe wieder vollends. (x = unbekannte Reaktivität des Antikörpers zwischen 30 und 45 kDa, dient gleichzeitig als Ladekontrolle)

4.2.5 Hemmstoffe der CSN-assoziierten Kinasen induzieren

die Ubiquitinierung und den Abbau von Id1 und Id3

Ausgehend von den Effekten, die unter dem Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf intrazelluläres c-Jun beobachtet werden konnten (s. Abschnitt 4.1.4), sollte untersucht werden, ob diese Substanzen ähnliche Wirkungen auf Id3 entfalten. Des Weiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den hochmolekularen Formen von Id3 um unterschiedlich stark ubiquitinierte Varianten dieses Proteins handelt und ob die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen die fragliche Ubiquitinierung von Id3 fördert und dadurch seinen Abbau beschleunigt. Dazu wurde Id3 erneut in HeLa-Zellen transient transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen für weitere vier Stunden mit 50 μ M Curcumin, 200 μ M DRB, 200 μ M Emodin oder 100 μ M Resveratrol behandelt. Der proteasomale Inhibitor

MG-132 wurde allein oder in Kombination mit den genannten Kinase-Hemmstoffen in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt. In allen Ansätzen wurde eine konstante DMSO-Konzentration von 0,25% (v/v) gewährleistet. Nach der Zellyse, wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-Id3-Antikörper untersucht.

Wie aus Abbildung 19A ersichtlich wird, induzierten alle vier Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle einen verstärkten Abbau von Id3 (linker unterer Quadrant). Im Gegensatz zu den Wirkungen auf c-Jun, die in einem analogen Versuch dokumentiert werden konnten (s. Abschnitt 4.1.4), besaß diesmal neben Curcumin auch Emodin die Fähigkeit, hochmolekulare Formen von Id3 (HMW-Id3) zu erzeugen (linker oberer Quadrant). Diese beiden Inhibitoren wiesen auch das größte Potential hinsichtlich der Bildung einer Bande unmittelbar unterhalb von 30 kDa auf. In Anwesenheit von MG-132 dagegen wurde Id3 stabilisiert. Auch die Kombination von MG-132 mit einem der Kinase-Hemmstoffe führte im Vergleich mit der alleinigen Kinase-Hemmstoff-Inkubation zu einer geringeren Destabilisierung von Id3 (rechter unterer Quadrant). Ebenso verstärkte MG-132 das Auftreten der hochmolekularen Formen von Id3, welche durch Curcumin und Emodin erzeugt wurden (rechter oberer Quadrant). Die Bande im Bereich von 30 kDa war in Gegenwart von MG-132 und speziell unter Einwirkung der Kombination von MG-132 mit Curcumin oder Emodin besonders intensiv.

Die Auftrennung der Proteine aus dem Lysat der HeLa-Zellen in einem 8%-igen SDS-Gel erbrachte nach darauffolgendem Western Blot und Immundetektion mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper den Nachweis, dass unter Curcumin und Emodin vermehrt hochmolekulare Ubiquitin-Konjugate gebildet wurden (Abbildung 19B, linke Spalte). Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass es sich bei den hochmolekularen Id3-Formen um mit Ubiquitin konjugiertes Id3 (Id3-Ub_n) handelt. Der Effekt von Emodin konnte durch MG-132 noch gesteigert werden, wobei auch schon MG-132 allein die Bildung der Ubiquitin-Konjugate verstärkte (Abbildung 19B, rechte Spalte).

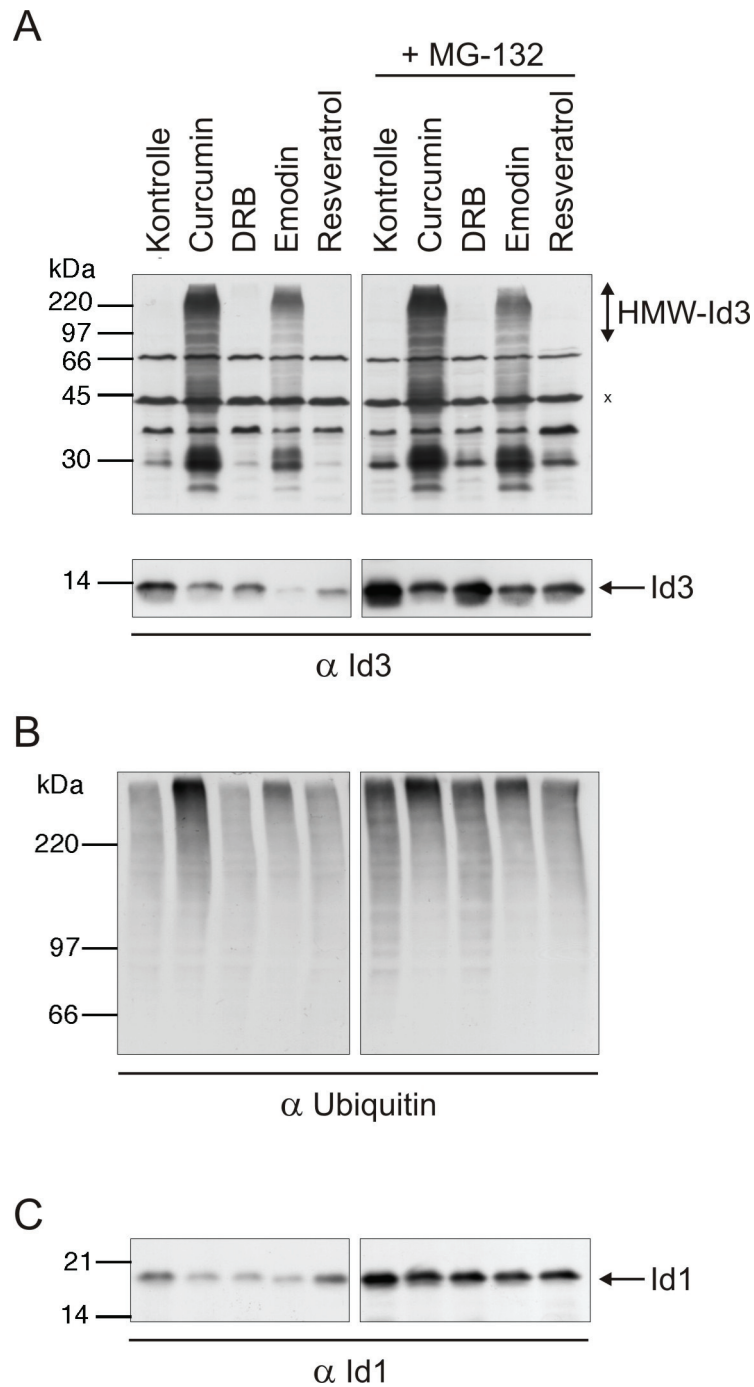


Abbildung 19: Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbau von Id1 und Id3. **(A)** HeLa-Zellen wurden transient mit Id3 transfiziert und dann mit 50 μ M Curcumin, 200 μ M DRB, 200 μ M Emodin, 100 μ M Resveratrol oder 20 μ M MG-132 behandelt. Die Zellen wurden nach vier Stunden Inkubation lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit einem anti-Id3-Antikörper (α Id3) untersucht. Die Kinase-Inhibitoren destabilisieren, MG-132 stabilisiert Id3 (linker und rechter unterer Quadrant). Curcumin und Emodin lassen hochmolekulare Id3-Formen und eine Bande direkt unterhalb von 30 kDa akkumulieren (linker oberer Quadrant), was durch MG-132 noch verstärkt wird (rechter oberer Quadrant). (x = unbekannte Reaktivität des anti-Id3-Antikörpers, dient gleichzeitig als Ladekontrolle) **(B)** Die gleichen Proben wurden in einem 8%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper (α Ubiquitin) getestet. Besonders die Behandlung mit Curcumin führte zu einer verstärkten Bildung von Ubiquitin-Konjugaten. **(C)** Die Stabilität von endogenem Id1 wurde unter Einfluss der unter (A) aufgeführten Hemmstoffe beobachtet. Im Western Blot konnten, verglichen mit den Ergebnissen von (A), mit einem anti-Id1-Antikörper (α Id1) ähnliche Auswirkungen der Inhibitoren auf die Stabilität von Id1 nachgewiesen werden.

Analoge Ergebnisse konnten hinsichtlich der Auswirkung der beschriebenen Hemmstoffe auf die Stabilität von endogenem Id1, dem nächsten Verwandten von Id3 innerhalb der Id-Proteinfamilie, erzielt werden. Auf der einen Seite destabilisierten bis auf Resveratrol alle eingesetzten Kinase-Inhibitoren erkennbar das Id1-Protein (Abbildung 19C, linke Spalte). Als Zweites führten Curcumin und Emodin wieder zu einer Akkumulation hochmolekularer Id1-Formen sowie einer der doppelten Proteingröße von Id1 entsprechenden, stark ausgeprägten Bande (nicht gezeigt). Und drittens stabilisierte MG-132 sowohl allein als auch in Kombination mit den Kinase-Hemmstoffen Id1 deutlich (Abbildung 19C, rechte Spalte).

Um die Bildung von Id3-Ubiquitin-Konjugaten zu bestätigen, wurde das Id3-pcDNA3.1-Konstrukt zusammen mit einem Vektor, der für His₁₀-markiertes Ubiquitin (His-Ub) kodiert, in HeLa-Zellen kotransfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 50 µM Curcumin für weitere vier Stunden inkubiert. Nach der Lyse der Zellen, der elektrophoretischen Proteinauftrennung und dem Transfer auf Nitrozellulose im Western Blot wurden die Membranen mit einem anti-His- und einem anti-Id3-Antikörper analysiert. Aus Abbildung 20A ist zu entnehmen, dass in den Lysaten aus Zellen, die sowohl His-Ub als auch Id3 überexprimieren, eine Bildung von hochmolekularen Ubiquitin- und Id3-Konjugaten detektiert werden kann. Unter dem Einfluss von Curcumin formten sich diese Konjugate in einer größeren Zahl.

In His-Pull-down-Experimenten sollte gezeigt werden, dass es sich bei den hochmolekularen Id3-Formen, die in den Lysaten der kotransfizierten Zellen nachweisbar waren, um Id3-Ubiquitin-Konjugate handelt. Mit magnetischen Ni-NTA-Agarosepartikeln (Ni-Partikel), die His-markierte Proteine binden, konnten hochmolekulare Proteinverbindungen präzipitiert werden, die sich mit einem anti-Id3-Antikörper als Id3-Ub_n-Konjugate identifizieren ließen (Abbildung 20B).

Mit Hilfe eines abschließenden Versuches sollte der Einfluss des COP9-Signalsoms auf die Regulation der Stabilität von Id3 noch von einer anderen Seite beleuchtet werden. Naumann et al. hatten gezeigt, dass die Überexpression der COP9-Signalsom-Untereinheit CSN2 zu einer *de novo*-Assemblierung des CSN-Komplexes führt, welche auch von einer Steigerung der CSN-vermittelten Kinaseaktivität begleitet wird. Letzteres äußert sich beispielsweise in einer Stabilisierung von c-Jun (Naumann et al., 1999).

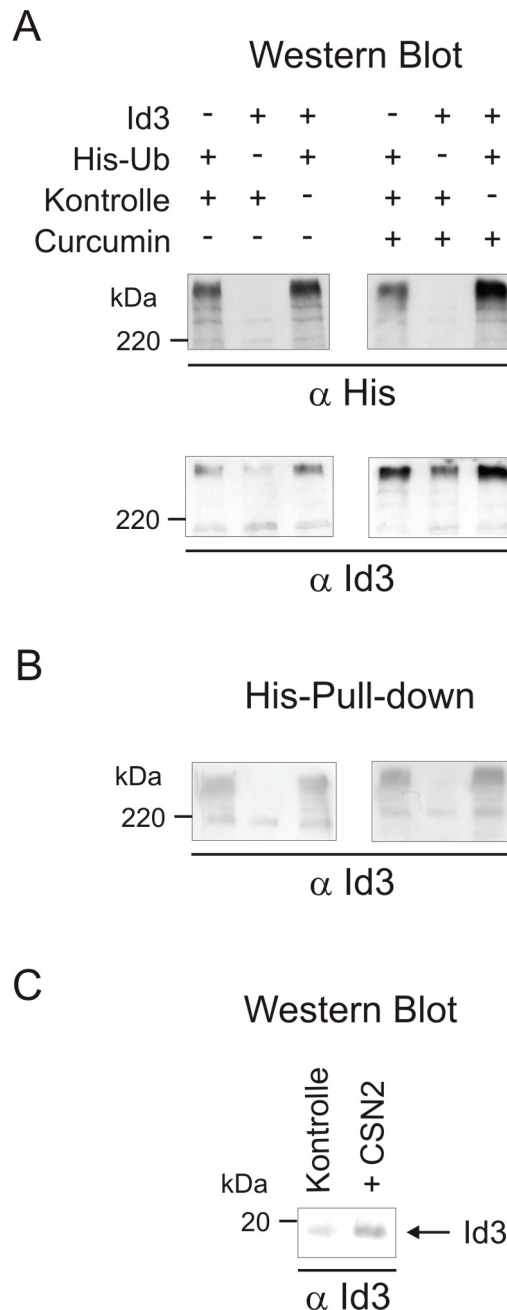


Abbildung 20: Das COP9-Signalosom stabilisiert Id3. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit Id3-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) oder/und His₁₀-Ubiquitin-cDNA (pEGFP-N3-Vektor) transient transfiziert. Fand keine Kotransfektion statt, wurde zum Ausgleich nur der pcDNA3.1-Vektor (Kontrolle) transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit oder ohne 50 μ M Curcumin weitere vier Stunden inkubiert. Nach Zellyse und SDS-PAGE wurden die Proteine im Western Blot mit anti-His (α HIS)- und anti-Id3 (α Id3)-Antikörpern untersucht. In den kotransfizierten Zellen akkumulierten hochmolekulare Ubiquitin- und Id3-Konjugate, was durch Curcumin noch verstärkt werden konnte. **(B)** Die selben Lysate wurden auch in einem His-Pull-down-Experiment mit magnetischen Ni-NTA-Agarosepartikeln (Ni-Partikel) eingesetzt. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und immunologischem Proteinnachweis durch einen anti-Id3-Antikörper (α Id3). Id3-Ubiquitin-Konjugate konnten präzipitiert werden, wiederum vermehrt unter Curcumineinfluss. **(C)** Flag-CSN2-cDNA (pcDNA3.1-Vektor) (+CSN2) oder der pcDNA3.1-Vektor ohne Insert (Kontrolle) wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine auf ein Gel geladen, in der SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Membranen mit einem anti-Id3-Antikörper (α Id3) behandelt. Id3 wurde durch die Überexpression von CSN2 deutlich stabilisiert.

Unter der Annahme eines ähnlichen Effekts einer solchen Überexpression auf intrazelluläres Id3, wurde die Untereinheit CSN2 in HeLa-Zellen transient transfiziert. In Abbildung 20C ist eindeutig zu erkennen, dass im Vergleich zu den mit einem Leervektor transfizierten Kontrollzellen die Überexpression von CSN2 eine Stabilisierung von endogenem Id3 zur Folge hat.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte das Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen, über die das COP9-Signalosom verschiedene Zellfunktionen steuert, erweitert werden. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Id3, und möglicherweise auch Id1, an den CSN-Komplex binden und dass diese Interaktion die Stabilität von Id1 und Id3 gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System beeinflusst. Im ersten Teil dieser Studie wurde die schon bekannte Wechselwirkung zwischen dem COP9-Signalosom und c-Jun eingehender untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Ubiquitin-abhängige Abbau von c-Jun in entscheidender Weise durch den CSN-Komplex reguliert wird. Über die Steuerung der Stabilität von Id1, Id3 und insbesondere c-Jun besitzt das COP9-Signalosom auch einen großen Einfluss auf die Regulation der Angiogenese. Am Beispiel der Abhängigkeit der VEGF-Produktion von der Kinaseaktivität des CSN-Komplexes konnte dieser Fakt verdeutlicht werden.

5.1 *Das COP9-Signalosom kontrolliert den Ubiquitin-abhängigen Abbau des proangiogenen Transkriptionsfaktors c-Jun*

5.1.1 c-Jun bindet an das COP9-Signalosom

Bereits vor der ersten Aufreinigung des COP9-Signalosoms aus humanen Erythrozyten (Seeger et al., 1998) war bekannt, dass JAB1 an c-Jun bindet (Claret et al., 1996). Als aber JAB1 als die fünfte Untereinheit des CSN-Komplexes identifiziert werden konnte und sich herausstellte, dass die mit dem Komplex assoziierte Kinaseaktivität auch c-Jun phosphoryliert, bekam diese Interaktion neues Gewicht. Somit war es wichtig, diese Wechselwirkung in HeLa-Zellen zu bestätigen (Abbildung 7). Mit Hilfe einer Immunpräzipitation und eines Pull-down-Experimentes konnte die Bindung zwischen c-Jun und CSN5 in wechselseitiger Richtung demonstriert werden (Abbildung 7A und 7B). Durch eine weitere Immunpräzipitation, die die Interaktion zwischen CSN5 und CSN7 zeigt (Abbildung 7D), sowie eine Dichtegradientenzentrifugation, in der CSN5 mit den Untereinheiten CSN3 und CSN8 ko-migriert und nur zu einem sehr geringen Teil in freier Form vorkommt (Abbildung 7C), wurde in HeLa-Zellen die Inkorporation von CSN5 in den CSN-Komplex nachgewiesen. Zusammengefasst besagen diese Resultate, dass c-Jun nicht nur an CSN5 bindet, sondern über diese Untereinheit auch

mit dem COP9-Signalosom interagiert. Diese Bindung bildet die Basis für die Phosphorylierung von c-Jun durch die mit dem CSN-Komplex assoziierten Kinasen.

5.1.2 Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen induzieren den Abbau von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Regulation des Proteinabbaus durch Phosphorylierung ist die Steuerung der Stabilität von c-Jun. Die Phosphorylierung von Ser63 und Ser73 innerhalb der δ -Domäne reduziert die Ubiquitinierung von c-Jun und verzögert dadurch seinen Abbau über das 26S-Proteasom (Treier et al., 1994; Fuchs et al., 1996; Musti et al., 1997). Anfangs galten die JNKs als die einzigen Kinasen, die c-Jun in seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne phosphorylieren. Gemeinsam mit dem COP9-Signalosom konnte allerdings auch eine Kinaseaktivität isoliert werden, die c-Jun ebenfalls an diesen beiden Serinresten phosphoryliert (Seeger et al., 1998) und hierdurch seinen Abbau verlangsamt (Henke et al., 1999; Naumann et al., 1999). Als die mit dem CSN-Komplex assoziierten Kinasen konnten von unserer Arbeitsgruppe kürzlich die CK2 und PKD identifiziert werden (Uhle et al., 2003). Eine weitere Kinase ist die IP-5/6-Kinase (Sun et al., 2002; Wilson et al., 2001). Bisher konnte aber der genaue Mechanismus, über den die CSN-abhängige Phosphorylierung c-Jun stabilisiert noch nicht aufgedeckt werden.

Zum eingehenderen Studium dieses Regulationsprozesses wurden verschiedene Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen eingesetzt. Besonderes Interesse galt dabei Curcumin. Frühere Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass Curcumin neben der Reduktion der mit dem CSN-Komplex assoziierten Kinaseaktivität auch eine Destabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Jun bewirkt (Henke et al., 1999; Pollmann et al., 2001). In dieser Studie konnte nun ein kausaler Zusammenhang zwischen der Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen durch Curcumin und dem beschleunigten Abbau von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System aufgezeigt werden.

Als Erstes ließ sich in einem Ubiquitinierungs-Assay nachweisen, dass Curcumin *in vitro* den Abbau von c-Jun induziert (Abbildung 8). Dabei fiel auf, dass sich im Verlauf von acht Stunden in Abwesenheit von Curcumin der Proteinspiegel von c-Jun kaum veränderte. Obwohl die Ubiquitinierung und die Proteolyse im 26S-

Proteasom jeweils ATP-abhängige Prozesse sind, ist nicht davon auszugehen, dass das Fehlen eines ATP-regenerierenden Systems die erhöhte Stabilität von c-Jun erklärt. Neben den eingesetzten 2 mM ATP enthielt der Ubiquitinierungs-Assay HeLa-Lysat, welches zur Regeneration von ATP beitragen könnte. Außerdem fand in Gegenwart von Curcumin auch ohne ATP-regenerierendes System ein suffizienter Proteinabbau statt, und schließlich konnte in einem ähnlichen System p53 ohne zusätzliche ATP-Regeneration erfolgreich abgebaut werden (Bech-Otschir et al., 2001). Andererseits könnte die Ursache der nahezu konstanten Proteinspiegel in einer ausgeprägten Phosphorylierung des rekombinanten c-Jun liegen. Dadurch würde sich nämlich seine Halbwertszeit von ca. 90 min fast vervierfachen (Lamph et al., 1988; Musti et al., 1997).

Zweitens führte Curcumin *in vitro* zu einer Akkumulation hochmolekularer Formen von c-Jun, welche als HMW (high molecular weight)-c-Jun bezeichnet wurden (Abbildung 8). In HeLa-Zellen induzierte Curcumin in Abhängigkeit von seiner Konzentration neben dem Abbau von c-Jun ebenfalls diese hochmolekularen Formen (Abbildung 9). Da sich ihre Ansammlung in Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG-132 weiter verstärkte und sie auch mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper kreuzreagierten, scheint es sich bei ihnen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Ubiquitin-Konjugate zu handeln. Die Reversibilität des Curcumin-Effektes hinsichtlich der Bildung HMW-c-Juns und der verlangsamte Rückgang dieser c-Jun-Formen in Anwesenheit von MG-132 unterstützen diese These (Abbildung 10).

Als Drittes stabilisierte der 26S-Proteasom-Hemmstoff MG-132 c-Jun in HeLa-Zellen (Abbildung 9 und 11). Auch in Kombination mit Curcumin reduzierte MG-132 den Abbau von c-Jun, was darauf hindeutet, dass die durch Curcumin beschleunigte Proteolyse von c-Jun über das 26S-Proteasom läuft.

Leider ist Curcumin kein spezifischer Hemmstoff der CSN-assoziierten Kinasen. Beispielsweise ist es auch als Inhibitor der Proteinkinasen PKC und PKA beschrieben worden (Hasmeda & Polya, 1996). Ebenso hemmt es den JNK-Signalweg (Chen & Tan, 1998), der eine sehr wichtige Rolle bei der Regulation der Stabilität und Aktivität von c-Jun spielt (s. Abschnitt 1.3 und 1.6.2.1). Allerdings konnte in diesem Fall die Kinase, die durch Curcumin inhibiert wird, nicht identifiziert werden. Darüber hinaus sind in Erythrozyten, HeLa-, HL-60 und MCF-7-Zellen die CSN-assoziierten Kinasen konstitutiv aktiv (Seeger et al., 1998; Bech-Otschir et al., 2001), während der JNK-Signalweg inaktiv ist und erst durch extrazelluläre Stimuli aktiviert wird (Dunn et al., 2002). Interessanterweise kann das COP9-

Signalosom über seine Untereinheit CSN1 sogar den JNK-Signalweg supprimieren (Spain et al., 1996; Tsuge et al., 2001).

Eine weitere Fähigkeit von Curcumin stellt möglicherweise auch die Hemmung deubiquitinernder Enzyme, so genannter Ubiquitin-Isopeptidasen, dar (Mullally & Fitzpatrick, 2002). Die reduzierte Aktivität der Ubiquitin-Isopeptidasen könnte zu der beobachteten Anhäufung von HMW-c-Jun bzw. Ubiquitin-Konjugaten beitragen (Abbildung 8 und 9). Jedoch behaupten die Autoren dieser Arbeit, dass die Hemmung der Ubiquitin-Isopeptidasen irreversibel ist, was mit den in Abbildung 10 präsentierten Ergebnissen nicht vereinbar ist. Weiterhin postulieren sie, dass die verminderte Ubiquitin-Isopeptidaseaktivität das Gleichgewicht zwischen Poly- und Monoubiquitin zugunsten der langkettigen Polymere verschiebt, wodurch der Ubiquitinierung potentieller Substrate das benötigte Monoubiquitin entzogen wird und letztlich die Substrate akkumulieren sollen. Ganz im Gegenteil aber wird c-Jun durch Curcumin deutlich destabilisiert (Abbildung 8, 9 und 10; Henke et al., 1999; Pollmann et al., 2001). Folglich kommt der Inhibition der Ubiquitin-Isopeptidasen durch Curcumin höchstens eine augmentative Funktion bei der Bildung von c-Jun-Ubiquitin-Konjugaten zu.

Auffällig war noch eine andere Eigenschaft von Curcumin. Sowohl c-Jun als auch Id3 bildeten in seiner Gegenwart Proteinverbindungen, die annähernd dem doppelten Molekulargewicht des jeweiligen Proteins entsprechen (Abbildung 8-11 bzw. 17-19). Höchstwahrscheinlich handelt es sich dabei aber nicht um Homodimere von c-Jun bzw. Id3. Zwar sind beide Proteine in der Lage, Homodimere zu formen (s. Abschnitt 1.3; Wibley et al., 1996), doch sind diese Dimere in der Regel nicht kovalent verknüpft. Eine kovalente Bindung wäre aber eine notwendige Voraussetzung für ihren Bestand während der denaturierenden Gelelektrophorese. Zudem weisen Untersuchungen an zuckerkranken Ratten darauf hin, dass Curcumin das Cross-linking von Proteinen eher verhindert als fördert (Sajithlal et al., 1998). Dass im Fall von überexprimiertem Flag-markiertem c-Jun diese Proteine auch mit einem anti-Flag-Antikörper, nicht aber mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper (Abbildung 9 und 11) detektiert werden konnten, spricht auf der anderen Seite gegen eine unspezifische Kreuzreaktivität des anti-c-Jun-Antikörpers sowie gegen die Vermutung, dass sich kurzkettenige c-Jun-Ubiquitin-Konjugate hinter diesen Proteinverbindungen verbergen. Was die wahre Natur dieser Abkömmlinge von c-Jun und Id3 ist, bleibt noch zu klären.

Ein Weg, die ungenügende Spezifität von Curcumin auszugleichen, führte zu dem

Einsatz anderer Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen. Für die Hemmstoffe der CK2, DRB und Emodin (Battistutta et al., 2000; Zandomeni, 1989), und den Inhibitor der PKD, Resveratrol (Haworth & Avkiran, 2001), konnte bereits in Kinase-Assays gezeigt werden, dass sie die Phosphorylierung von rekombinanten c-Jun durch die CK2, die PKD oder den aufgereinigten CSN-Komplex supprimieren (Uhle et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurden diese Ergebnisse auf zellulärer Ebene bestätigt. Über die Hemmung der Phosphorylierung von c-Jun induzierten sie in HeLa-Zellen dessen Abbau (Abbildung 11). Dass dieser über das 26S-Proteasom läuft, kann aus der Stabilisierung von c-Jun durch die zusätzliche Inkubation mit MG-132 geschlossen werden. Anders als Curcumin erzeugen aber weder DRB noch Emodin oder Resveratrol HMW-c-Jun. *In vitro*-Studien ergaben, dass Curcumin sowohl bezüglich der rekombinanten Kinasen CK2 und PKD als auch in Bezug auf den isolierten CSN-Komplex von allen vier Inhibitoren den kleinsten K_i -Wert besitzt (Uhle et al., 2003). Damit einhergehend hemmt es beide Kinasen mit nahezu gleich hoher Potenz. Deshalb ließe sich spekulieren, dass für die den proteasomalen Abbau übersteigende Akkumulation von HMW-c-Jun eine effektive Suppression beider CSN-assoziierten Kinasen notwendig ist.

5.1.3 Modell des CSN-kontrollierten Abbaus von c-Jun

Das COP9-Signalosom interagiert mit nahezu allen Komplexen, die im Prozess des Proteinabbaus eine zentrale Stellung einnehmen. Zu nennen wären diesbezüglich das 26S-Proteasom (Kwok et al., 1999; Peng et al., 2003) und eine spezielle Klasse von E3s, die Cullin-haltigen Ubiquitinligasen, zu denen beispielsweise die SCF-Komplexe gehören (Peng et al., 2003; Schwechheimer et al., 2001; Wolf et al., 2003). Neben dieser strukturellen Beziehung existiert auch eine funktionelle Wechselwirkung zwischen beiden Proteinkomplexen und dem COP9-Signalosom. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde (s. Abschnitt 1.6.2.2), verfügt der CSN-Komplex nicht nur über eine assoziierte Kinaseaktivität sondern auch über eine intrinsische Deneddylasefunktion (Cope et al., 2002), die Nedd8 von Cullin abspaltet und dadurch die Ligaseaktivität der Cullin-haltigen E3s reduziert (Lyapina et al., 2001; Wolf et al., 2003). Mit einer Ubiquitin-Isopeptidaseaktivität, die die Abspaltung von Ubiquitin katalysiert, konnte das Spektrum der CSN-assoziierten Funktionen um eine dritte Position erweitert werden (Groisman et al., 2003; Zhou et al., 2003). Auch diese Aktivität steht mit der Regulation von

bestimmten Cullin-haltigen E3s, den SCF-Komplexen, in Verbindung, da sie die Autoubiquitinierung von Komponenten des SCF-Komplexes verhindert und somit den Komplex stabilisiert (Zhou et al., 2003).

Kürzlich konnten gleich drei verschiedene Ubiquitinligasen identifiziert werden, die c-Jun ubiquitinieren. Zum Einen handelt es sich dabei um das zum HECT-Typ der Ubiquitinligasen gehörende Protein Itch/AIP4 (Fang & Kerppola, 2004), welches zuvor schon als E3 von JunB beschrieben worden ist (Fang et al., 2002). Die beiden anderen Ligasen stellen dagegen größere Proteinkomplexe vom RING-Typ dar. Eine von ihnen, SCF^{Fbw7}, gehört der im vorhergehenden Absatz erwähnten Klasse der SCF-Komplexe an (Nateri et al., 2004). Indessen repräsentiert der zweite Komplex, der sich aus den Untereinheiten DET1, DDB1, Cullin4A (Cul4A), ROC1 und COP1 zusammensetzt und in Analogie zur Nomenklatur der SCF-Komplexe als DCX^{hDET1-hCOP1}(DDB1, Cul4A, X-Box) bezeichnet wird (Wertz et al., 2004), eine andere Klasse von Ubiquitinligasen des RING-Typs. In einer früheren Arbeit konnte bereits die Interaktion von c-Jun mit humanem COP1 aufgedeckt werden (Bianchi et al., 2003), welches in *Arabidopsis* als E3 des Transkriptionsfaktors HY5 agiert (Osterlund et al., 2000), der wie c-Jun ein Mitglied der Proteinfamilie der basischen Leuzinzipper (bZIP) ist. Da allgemein Cullin-haltige E3s über ihre Cullin-Untereinheit an den CSN-Komplex binden (Wolf et al., 2003) und diese Assoziation für einen mit DCX^{hDET1-hCOP1} verwandten Proteinkomplex, der die Untereinheiten DDB1, Cul4A und ROC1 beinhaltet, explizit gezeigt werden konnte (Groisman et al., 2003), ist eine Wechselwirkung zwischen DCX^{hDET1-hCOP1} und dem COP9-Signalosom sehr wahrscheinlich. Ferner wäre auch über COP10, das sowohl an COP1 als auch an das COP9-Signalosom bindet (Suzuki et al., 2002), eine Assoziation von DCX^{hDET1-hCOP1} mit dem CSN-Komplex vorstellbar. Damit würden gleich zwei der drei Ubiquitinligasen von c-Jun, SCF^{Fbw7} und DCX^{hDET1-hCOP1}, mit dem COP9-Signalosom interagieren.

Im Lichte der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergibt sich das folgende Szenario für den CSN-gesteuerten Abbau von c-Jun (Abbildung 21): Das COP9-Signalosom bildet mit dem 26S-Proteasom und bestimmten Ubiquitinligasen wie SCF^{Fbw7}, oder möglicherweise auch DCX^{hDET1-hCOP1}, ein Komplexkonglomerat, in dem die wichtigsten Bestandteile der Abbaumaschinerie für c-Jun vertreten sind. Einerseits reguliert es durch seine Deneddylase- und Ubiquitin-Isopeptidaseaktivität die Ligasefunktion des assoziierten SCF-Komplexes (Schwechheimer et al., 2001; Lyapina et al., 2001; Groisman et al., 2003; Zhou et al., 2003). Nach

dem „statischen Modell“ der Neddylierung von Cullin1 (von Arnim, 2003) inhibiert die CSN-abhängige Deneddylierung diese Ligaseaktivität. Auf der anderen Seite ist das COP9-Signalosom auch eine Plattform für die Kinasen CK2 und PKD, die durch ihre Phosphorylierung die Bindung von Substratproteinen an ihre jeweiligen Ubiquitinligasen beeinflussen (Pollmann et al., 2001; Uhle et al., 2003).

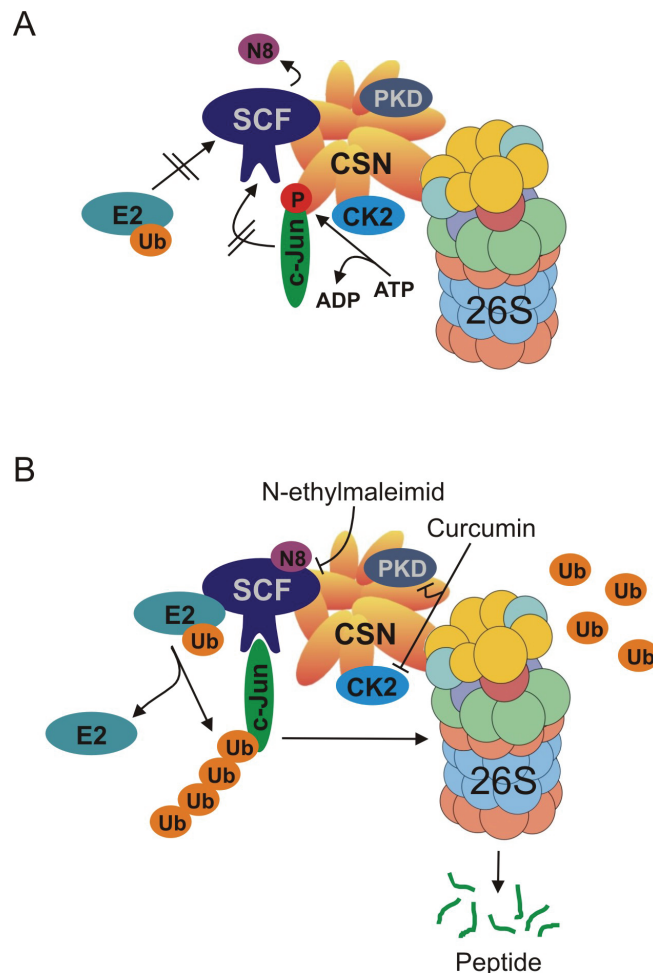


Abbildung 21: Regulation des Abbaus von c-Jun durch das COP9-Signalosom. **(A)** Unter Einfluss des COP9-Signalosoms (CSN) wird die Ubiquitinligase SCF^{Fbw7} (SCF) deneddyliert (N8=Nedd8), wodurch sich ihre Affinität gegenüber dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und ihre Ligaseaktivität vermindern. Die CSN-gebundenen Kinasen CK2 und PKD phosphorylieren (P) andererseits c-Jun und inhibieren dadurch seine Assoziation mit dem SCF-Komplex. Diese beiden Funktionen eines aktiven CSN-Komplexes verhindern, dass c-Jun ubiquitiniert und vom 26S-Proteasom (26S) abgebaut wird. **(B)** Curcumin und N-ethylmaleimid hemmen die Kinase- bzw. Deneddylaseaktivität des COP9-Signalosoms. Folglich wird weder c-Jun durch die CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert noch wird die Ubiquitinligase SCF^{Fbw7} deneddyliert, d. h. sie liegt in ihrer neddylierten und damit aktiven Form vor. In Zusammenarbeit mit einem rekrutierten E2 ubiquitiniert SCF^{Fbw7} c-Jun. Dieses wird daraufhin vom 26S-Proteasom erkannt und zu Peptidfragmenten abgebaut. Die Polyubiquitinkette wird in ihre monomeren Bestandteile (Ub=Ubiquitin) zerlegt, die dann für erneute Substrat-Ubiquitinierungen zur Verfügung stehen.

Im Fall von c-Jun bewirkt die Phosphorylierung eine verminderte Affinität gegenüber seinem E3, wodurch die Ubiquitinierung von c-Jun gehemmt wird. Folglich

wird c-Jun stabilisiert. Phosphopeptidanalysen und Vergleiche mit Konsensussequenzen ergaben, dass die CK2 c-Jun höchstwahrscheinlich an Thr62 phosphoryliert (Seeger et al., 1998; Uhle et al., 2003). Ihre Phosphorylierungsstelle ist somit nicht mit den Angriffsorten der JNK, Ser63 und Ser73, identisch. Bisher galt, dass die durch die JNK katalysierte Phosphorylierung den Abbau von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System verlangsamt (Musti et al., 1997). Allerdings kam kürzlich eine Studie genau zu dem entgegengesetzten Resultat, nämlich dass die JNK-abhängige Phosphorylierung eine verstärkte Ubiquitinierung von c-Jun durch SCF^{Fbw7} induziert und dadurch seinen Abbau beschleunigt (Nateri et al., 2004). Daher wäre es denkbar, dass die Position der Phosphorylierung innerhalb des Proteins darüber entscheidet, ob sich die Affinität von c-Jun gegenüber SCF^{Fbw7} erhöht oder verringert, wobei die Phosphorylierung an Thr62 protektiv, die an Ser63/73 destabilisierend wirkt.

5.1.4 Das COP9-Signalosom reguliert die c-Jun-abhängige VEGF-Synthese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das COP9-Signalosom eine wichtige Rolle in der Regulation des Abbaus von c-Jun über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System spielt, stellte sich sogleich die Frage nach den funktionellen Konsequenzen einer veränderten Stabilität von c-Jun. Dabei zeigte sich, dass alle Inhibitoren der CK2 und PKD neben der Destabilisierung von c-Jun auch signifikant die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen supprimieren (Abbildung 13). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Resultaten unserer Arbeitsgruppe, die besagen, dass die Aktivität von AP-1 in HeLa- und HL-60-Zellen für ca. 75% der basalen Transkription des VEGF-Gens verantwortlich ist und dass Curcumin diese c-Jun-abhängige VEGF-Synthese effektiv inhibiert (Pollmann et al., 2001). Nachfolgende *in vitro*-Untersuchungen (Uhle et al., 2003) sowie die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das damals aufgestellte Modell, wonach die CSN-assoziierten Kinasen durch Phosphorylierung c-Jun stabilisieren, welches daraufhin als Bestandteil von AP-1 seinen Beitrag zur zellulären VEGF-Produktion leistet (Abbildung 22).

Dieser Regulationsmechanismus setzt somit auch die CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD mit dem Prozess der Angiogenese in einen biologischen Zusammenhang. Interessanterweise wurde eine Beziehung zwischen diesen Kinasen und malignen Tumoren mehrfach beschrieben (Guerra & Issinger, 1999; Van Lint et al., 2002). Die Beteiligung der CK2 und PKD an der Steuerung der VEGF-Produktion durch den CSN-Komplex liefert nun eine kausale Grundlage dieser

Beobachtungen.

Andererseits erklärt das Modell der Kontrolle der VEGF-Synthese durch CSN-abhängige Phosphorylierung und Stabilisierung von c-Jun auch sehr gut die bekannten antikarzinogenen und antiangiogenen Effekte im Wirkungsspektrum der verwendeten Kinase-Inhibitoren. Insbesondere Curcumin und Emodin gelten in der fernöstlichen und indischen Kultur als traditionelle Heilmittel. Erste wissenschaftliche Studien in den frühen 70er Jahren konnten eine antiinflammatorische Wirkung des Curcumins aufzeigen (Arora et al., 1971). Seither wurden neben der antioxidativen (Reddy & Lokesh, 1994; Sreejayan & Rao, 1994) auch antitumorgene (Huang et al., 1994; Aggarwal et al., 2003) und antiangiogene (Pollmann et al., 2001; Arbiser et al., 1998) Eigenschaften erforscht. Emodin, das aus *Polygonum cuspidatum* (Japanischer Staudenknöterich) gewonnen wird, ist ebenfalls antiinflammatorisch, antioxidativ (Malterud et al., 1993), immunsuppressiv (Huang et al., 1992) und antiproliferativ bzw. antitumorgen (Lee, 2001; Zhang et al., 1995) wirksam. Auch Resveratrol, welches erstmals 1940 aus der Wurzel von *Veratrum grandiflorum* (weiße Nieswurz) isoliert werden konnte und als Bestandteil der Schale der roten Weintraube für die kardioprotektiven Eigenschaften des Rotweins verantwortlich gemacht wird, besitzt antiinflammatorische, antioxidative, antikarzinogene und antiangiogene Effekte (Aggarwal et al., 2004).

Die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen durch diese oder noch spezifischere Inhibitoren stellt damit einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt bei der Unterdrückung der Tumorangiogenese dar. Hinzu kommt, dass mit der Herabsetzung der Kinaseaktivität des CSN-Komplexes gleichzeitig eine Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 verbunden ist (Bech-Otschir et al., 2001), das neben der Initiation maligner Tumoren auch die Angiogenese im Allgemeinen und die Synthese von VEGF im Speziellen unterdrückt (Bouvet et al., 1998; Kerbel & Folkman, 2002). Analog zu c-Jun wird p53 nach seiner Bindung an CSN5 durch die CSN-gebundenen Kinasen CK2 und PKD phosphoryliert (Uhle et al., 2003). Im Gegensatz zu c-Jun aber wird daraufhin sein Abbau über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System induziert (Bech-Otschir et al., 2001), weshalb eine Inhibition der Kinasen seinen intrazellulären Proteinspiegel erhöht (Abbildung 22).

Erstaunlicherweise vermindert auch der proteasomale Hemmstoff MG-132 signifikant die VEGF-Produktion in HeLa-Zellen, obwohl er eine Stabilisierung von c-Jun bewirkt (Abbildung 13). Dieser scheinbare Widerspruch löst sich sofort auf, wenn man bedenkt, dass durch die Inhibition des 26S-Proteasoms eine Vielzahl

von Proteinen akkumuliert, die auf einem c-Jun-unabhängigen Weg die Synthese von VEGF beeinflussen können. Zum Einen induzieren proteasomale Inhibitoren die Apoptose von - vornehmlich malignen - Zellen (Almond & Cohen, 2002). Dadurch sinkt natürlich auch die Menge des von dieser Zellpopulation produzierten Wachstumsfaktors VEGF. Als Zweites verhindern sie den Abbau von I κ B α , welches NF- κ B im Zytosol sequestriert (Karin & Ben-Neriah, 2000) und auf diese Weise die NF- κ B-abhängige Expression von VEGF reduziert (Sunwoo et al., 2001). Des Weiteren legt die Tatsache, dass die Kombination von MG-132 mit einem Kinase-Hemmstoff die Synthese von VEGF in einem Maß verringert, das ungefähr dem Produkt der Einzeleffekte dieser Substanzen entspricht (s. Abschnitt 4.1.5 und Abbildung 12), den Verdacht nahe, dass MG-132 und die Kinase-Hemmstoffe unabhängig voneinander die VEGF-Produktion von HeLa-Zellen supprimieren. Diese Fakten unterstreichen auch die Bedeutung von Proteasom-Hemmstoffen als mögliche Therapeutika im Kampf gegen die Angiogenese maligner Tumoren und weisen auf einen Effizienzgewinn einer Kombinationstherapie mit anderen Angiogenese-Inhibitoren hin.

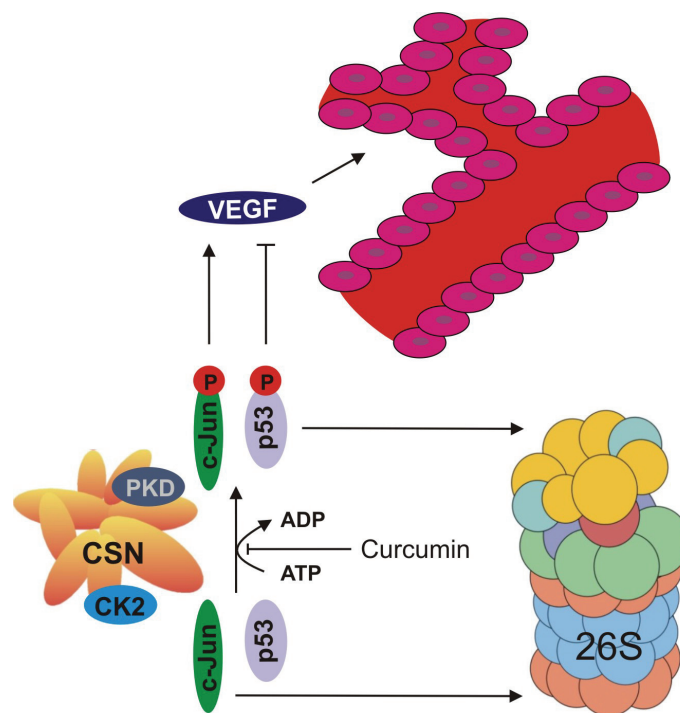


Abbildung 22: Regulation der Angiogenese durch das COP9-Signalosom (CSN). Die CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD phosphorylieren die Substratproteine c-Jun und p53, welche daraufhin entweder stabilisiert (c-Jun) oder beschleunigt über das 26S-Proteasom (26S) abgebaut (p53) werden. Die dazwischen liegende Ubiquitinierung ist der Einfachheit halber nicht dargestellt. C-Jun steigert, p53 vermindert die Expression von VEGF, welches als potenter proangiogener Faktor die Bildung neuer Kapillaren induziert. Kinase-Inhibitoren wie Curcumin hemmen die CSN-abhängige Phosphorylierung. Dadurch wird nun p53 stabilisiert und c-Jun vermehrt abgebaut, was zur Folge hat, dass auch die Expression von VEGF absinkt.

5.2 Das COP9-Signalosom reguliert die Stabilität von Id1 und Id3

5.2.1 Id3 bindet an das COP9-Signalosom

Den Ausgangspunkt der Erforschung der Wechselwirkung zwischen Id3 und dem CSN-Komplex bildeten Two-hybrid-Analysen der Arbeitsgruppe von Barbara Christy. Diese Untersuchungen ergaben, dass sowohl Id1 als auch Id3, aber nicht die beiden anderen Mitglieder der Id-Familie, Id2 und Id4, mit CSN5 interagieren (Berse et al., 2004). Eine solche Uneinheitlichkeit im Verhalten der verschiedenen Id-Proteine ist nicht besonders überraschend. Auf der einen Seite weisen Id1 und Id3 die ausgeprägteste Sequenzhomologie innerhalb der Gruppe der Id-Proteine auf (Massari & Murre, 2000). Andererseits unterscheiden sich auch Id1 und Id3 in funktioneller Hinsicht teilweise von Id2 und Id4. Beispielsweise spielen die beiden Erstgenannten eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese (Lyden et al., 1999), wogegen die biologische Bedeutung der beiden Letzteren in der Entwicklung von natürlichen Killerzellen bzw. von Oligodendrozyten liegt (Yokota, 2001).

In dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass Id3 an das COP9-Signalosom bindet. Pull-down-Experimente demonstrierten die Interaktion von rekombinantem Id3 mit dem CSN-Komplex (Abbildung 14B). Die spezifischen Untereinheiten konnten mit Hilfe von Far-Western-Blots und weiteren Pull-down-Versuchen identifiziert werden (Abbildung 14A und 14B). Eine Wechselwirkung von Id3 mit CSN5 bestätigte dabei die zuvor beschriebenen Two-hybrid-Ergebnisse. Zusätzlich war auch eine Bindung von Id3 an CSN7 festzustellen. Da innerhalb des CSN-Komplexes auch eine Interaktion zwischen CSN7 und CSN5 besteht (Kapelari et al., 2000; Fu et al., 2001), wäre eine simultane Bindung von Id3 an beide Untereinheiten durchaus denkbar. Interessanterweise repräsentiert CSN5 die Untereinheit des Komplexes, mit der die meisten seiner Substrate wechselwirken (Bech-Otschir et al., 2002). CSN7 dagegen ist eine wichtige Bindungsstelle für die mit dem COP9-Signalosom assoziierte Kinase CK2 (Uhle et al., 2003).

5.2.2 Id3 inhibiert die CSN-assozierte Kinaseaktivität

Obwohl Id3 wie viele andere Substrate der CSN-gebundenen Kinasen mit CSN5 interagiert (Bech-Otschir et al., 2002), wurde es weder von dem isolierten CSN-Komplex noch von den rekombinanten Kinasen CK2 und PKD, die mit ihm assoziiert sind, phosphoryliert (Abbildung 15). In Übereinstimmung damit konnte im Fall

(Sakurai et al., 2004). Daher wäre ein negativer Rückkopplungsmechanismus der Angiogenese vorstellbar, in dem hohe Proteinspiegel von Id3 den CSN-abhängigen Abbau von c-Jun induzieren, woraufhin sich die Expression von VEGF, das seine biologische Wirkung zum Teil über Id3 entfaltet, reduziert (Abbildung 23).

5.2.3 Inhibitoren der CSN-assoziierten Kinasen initiieren die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Id1 und Id3

In Gegenwart von Curcumin bildeten sich sowohl in einem *in vitro*-System (Abbildung 16) als auch in HeLa-Zellen (Abbildung 17) hochmolekulare Formen von Id3 (HMW-Id3). Zusätzlich wurde Id3 in dem zellulären Umfeld durch Curcumin destabilisiert (Abbildung 17). Beide Effekte, Induktion von HMW-Id3 und Destabilisierung von Id3, waren reversibel (Abbildung 18). Das zu c-Jun analoge Auftreten einer annähernd dem doppelten Molekulargewicht von Id3 entsprechenden Bande in Anwesenheit von Curcumin (Abbildung 17–19) wurde bereits in Abschnitt 5.1.2 ausführlich diskutiert. Auch die anderen Kinase-Inhibitoren, Emodin, DRB und Resveratrol, verminderten den intrazellulären Proteinspiegel von Id3 (Abbildung 19A). Emodin war analog zu Curcumin in der Lage, HMW-Id3 sowie eine prominente Bande unmittelbar unterhalb 30 kDa zu erzeugen (Abbildung 19A). Unter Einsatz von His-Pull-down-Experimenten gelang es, in Lysaten von HeLa-Zellen, die His₁₀-markiertes Ubiquitin überexprimierten, die hochmolekularen Id3-Formen als Id3-Ubiquitin-Konjugate zu identifizieren (Abbildung 20A und 20B), was aufgrund der allgemeinen Zunahme von Polyubiquitin-Verbindungen in Anwesenheit von Curcumin, und teilweise auch Emodin, bereits vermutet werden konnte (Abbildung 19B). Aus den Beobachtungen, dass MG-132 Id3 deutlich stabilisiert (Abbildung 17, 18 und 19A) und die durch Curcumin und Emodin hervorgerufene Akkumulation von HMW-Id3 verstärkt (Abbildung 19A und 17B), muss gefolgert werden, dass die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen nicht nur die Ubiquitinierung von Id3 induziert, sondern auch seinen Abbau über das 26S-Proteasom beschleunigt.

Andererseits sollte ein aktives COP9-Signalosom Id3 stabilisieren. Dies konnte durch die Überexpression der Untereinheit CSN2 demonstriert werden. Für eine derartig unphysiologisch gesteigerte Expression von CSN2 war gezeigt worden, dass sie zu einer *de novo*-Assemblierung des CSN-Komplexes führt, welche gleichzeitig mit einer erhöhten Komplexaktivität verbunden ist

(Naumann et al., 1999; Pollmann et al., 2001). Wie erwartet wurde die CSN2-Überexpression von einer Stabilisierung von Id3 begleitet (Abbildung 20C).

Abbildung 19C ist zu entnehmen, dass die intrazellulären Proteinspiegel von Id1 auf ähnliche Weise von der CSN-vermittelten Phosphorylierung abhängen. Auch Id1 wird durch die vier eingesetzten Kinase-Inhibitoren destabilisiert, wobei wiederum Curcumin, und in geringerem Ausmaß auch Emodin, hochmolekulare Formen von Id1 und eine intensive Bande unterhalb von 30 kDa erzeugen (nicht abgebildet). Für Id1 und Id3 stellt sich somit eine vergleichbare Konstellation wie für c-Jun dar. Die Kinase-Hemmstoffe DRB und Resveratrol besitzen auch im Fall von c-Jun, verglichen mit Curcumin und Emodin, eine geringere Effektivität hinsichtlich der Stimulation der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse (s. Abschnitt 4.1.4 und 5.1.2). Im Gegensatz zu c-Jun wird aber Id3 selbst nicht durch die CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert. Daher kommt eine Phosphorylierung von Id3 als Ursache seiner Stabilisierung gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System in Abwesenheit der Kinase-Inhibitoren nicht in Betracht. Der genaue Mechanismus des CSN-kontrollierten Abbaus von Id1 und Id3 bleibt also vorerst unaufgedeckt. Dennoch lassen sich begründete Hypothesen über seine wahre Natur aufstellen.

5.2.4 Modell des CSN-abhängigen Abbaus von Id3

In der Arbeit, in der der Ubiquitin-abhängige Abbau von Id1, Id2 und Id3 über das 26S-Proteasom erstmals beschrieben wurde, untersuchten die Autoren auch den Einfluss von dem bHLH-Protein E47, einem wichtigen Bindungspartner der Id-Proteine, auf die Abbaurate von Id3 (Bounpheng et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass der Abbau von Id3 bei gleichzeitiger Kotransfektion von E47 signifikant vermindert wird, höchstwahrscheinlich infolge eines protektiven Effekts der Heterodimerisierung von Id3 mit E47 (Bounpheng et al., 1999; Deed et al., 1996). Im Gegensatz zu Id3 stellt E47 ein Substrat der CK2 dar (Johnson et al., 1996). Möglicherweise stabilisiert die CK2-abhängige Phosphorylierung von E47 das Id3-E47-Heterodimer, wie auch die Phosphorylierung von E47 durch andere Kinasen seine Affinität gegenüber potentiellen Dimerisierungspartnern erhöht (Lluis et al., 2005). Die Hemmung der CK2 durch spezifische Kinase-Inhibitoren würde demnach der protektiven Heterodimerisierung zwischen Id3 und E47 entgegenwirken und auf diese Weise den Abbau von monomerem Id3 über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System induzieren (Abbildung 24A).

Bemerkenswerterweise ist in Abwesenheit von E47 der Transkriptionsregulator Id3 ausschließlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Deed et al., 1996). Erst die Kotransfektion von E47 bewirkt eine Translokation von Id3 in den Zellkern, da E47 ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzt, welches Id3 fehlt (Deed et al., 1996). Der Export von freiem Id3 aus dem Zellkern könnte in Analogie zu p27^{Kip1} durch das COP9-Signalosom vermittelt werden. Im Zellkern ansässiges p27^{Kip1}, das kein nukleäres Exportsignal (NES) aufweist, ist stabil, während der CSN-abhängige Transport ins Zytoplasma die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau des Zellzyklus-Inhibitors zur Folge hat (Tomoda et al., 1999). Im Fall von Id3 könnte dieser Prozess durch Phosphorylierung geregelt werden. Allerdings scheint die Bindung von Id3 an E47 von weitaus größerer Bedeutung für seine Stabilisierung gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System zu sein als seine E47-gesteuerte Translokation in den Zellkern (Deed et al., 1996).

Darüber hinaus kommt der CSN-abhängigen Phosphorylierung vielleicht noch eine andere Funktion bei der Kontrolle des Abbaus von Id1 und Id3 zu. Die CSN-assoziierten Kinasen könnten die Ubiquitinligase(n) von Id1 und Id3 modifizieren. Dabei würde die phosphorylierte Ligase die inaktive Form repräsentieren. Kinase-Inhibitoren könnten die Proteolyse von Id1 und Id3 beschleunigen, indem sie die Ubiquitinligase in ihren aktiven Zustand überführten (Abbildung 24B). Ähnliche Szenarien der Regulation der Ligaseaktivität durch Phosphorylierung konnten für diverse E3s aus verschiedenen Familien nachgewiesen werden (Hall et al., 2004; Hayami et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Winter et al., 2004). Besonders interessant erscheint hierbei, dass jedes Mal die Phosphorylierung der Ligase zu einer Reduktion ihrer Aktivität führte. Bisher konnte die Ligase, die Id1 und Id3 ubiquitiniert, allerdings noch nicht identifiziert werden.

Kürzlich konnte für Id2 eine außergewöhnliche Form der Ubiquitinierung beschrieben werden (Fajerman et al., 2004). Statt wie gewöhnlich an einer internen ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins zu beginnen, startet die Ubiquitinierung von Id2 an der freien α -NH₂-Gruppe des Proteins. Ob diese Variante der Anknüpfung einer Ubiquitinkette auch für andere Id-Proteine eine Rolle spielt und inwieweit sie für den CSN-abhängigen Abbau von Id1 und Id3 von Belang ist, bleibt noch zu klären. Zusätzliche Studien sind somit notwendig, will man den zugrunde liegenden Mechanismus des CSN-kontrollierten Abbaus von Id1 und Id3 besser verstehen.

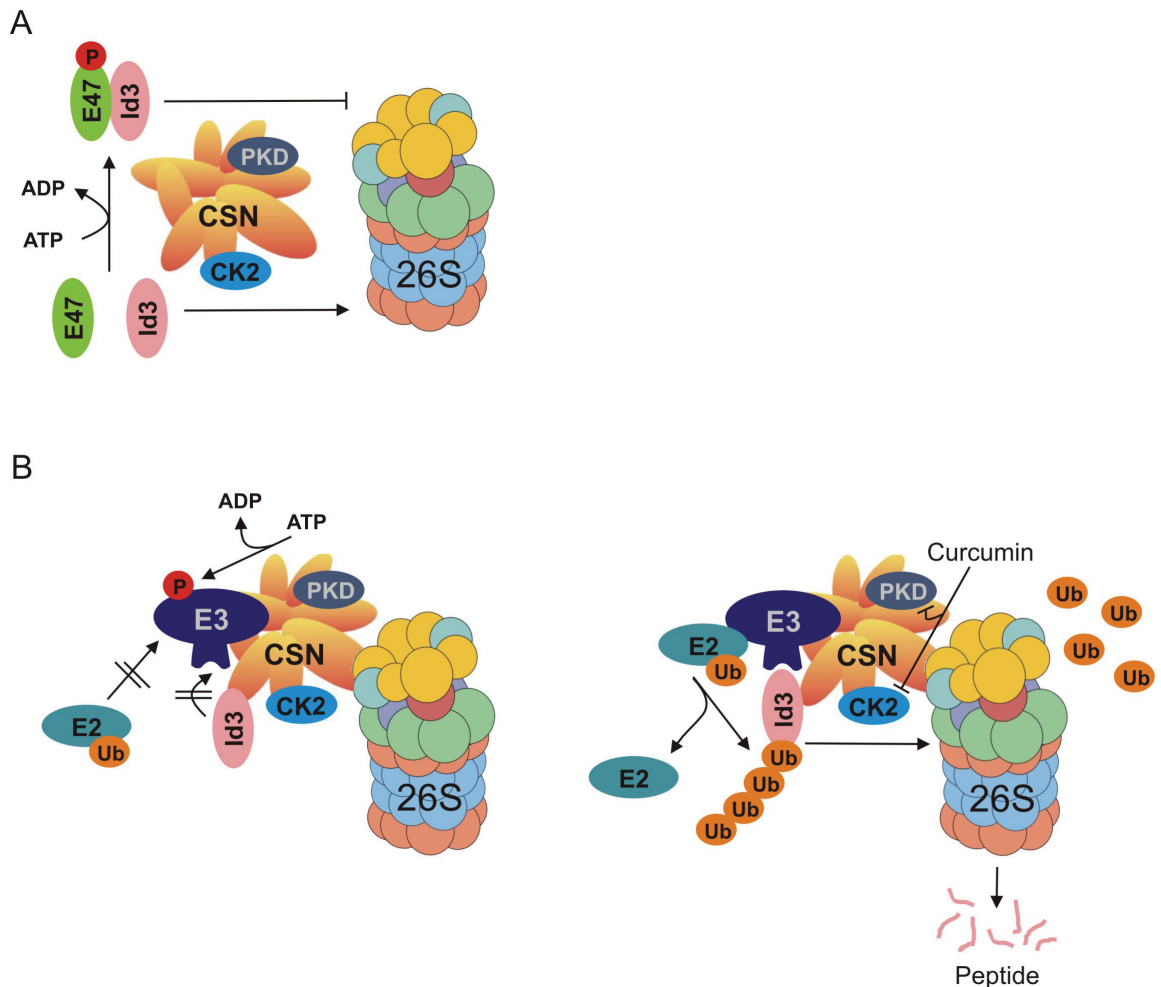


Abbildung 24: Zwei Modelle der Regulation der Stabilität von Id3 durch das COP9-Signalosom. **(A)** Die CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD phosphorylieren den Bindungspartner von Id3, das bHLH-Protein E47. Möglichweise fungiert Id3 dabei als Adapter, da es über CSN5 und CSN7 an den CSN-Komplex bindet. Phosphoryliertes E47 besitzt eine größere Affinität gegenüber Id3 und verhindert dadurch dessen Abbau über das 26S-Proteasom (26S). **(B)** Diesmal phosphorylieren die CSN-assoziierten Kinasen die Ubiquitinligase (E3) von Id3, welche dadurch eine geringe Assoziationsbereitschaft gegenüber ihrem Substrat Id3, und eventuell auch gegenüber dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2), aufweist (linke Hälfte). Folglich wird Id3 nicht vom 26S-Proteasom abgebaut. In Anwesenheit eines Inhibitors der CK2 und PKD, z. B. Curcumin, wird die Phosphorylierung des E3 unterdrückt (rechte Hälfte). Das E3 bindet verstärkt Id3 und ubiquitiniert (Ub=Ubiquitin) dieses zusammen mit einem rekrutierten E2. Schließlich wird das so markierte Id3 vom 26S-Proteasom zu Peptidfragmenten abgebaut.

Auch wenn man diesen noch nicht exakt rekonstruieren kann, weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass das COP9-Signalosom mit Id1 und Id3 neben c-Jun zwei weitere wichtige Angiogene reguliert und deshalb als potentielles Ziel einer antiangiogenen Therapie an Bedeutung gewinnt.

Literaturverzeichnis

- Aggarwal et al., 2004: Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S. & Takada, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, **24**, 2783–2840, 2004.
- Aggarwal et al., 2003: Aggarwal, B. B., Kumar, A. & Bharti, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, **23**, 363–398, 2003.
- Alani et al., 1999: Alani, R. M., Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M. C., Israel, M. A. & Munger, K. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix–loop–helix protein, Id-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9637–9641, 1999.
- Almond & Cohen, 2002: Almond, J. B. & Cohen, G. M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, **16**, 433–443, 2002.
- Angel et al., 1988: Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. & Karin, M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, **55**, 875–885, 1988.
- Angel et al., 1987: Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729–739, 1987.
- Arbiser et al., 1998: Arbiser, J. L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M. T., Fisher, C., Flynn, E. & Byers, H. R. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol. Med.*, **4**, 376–383, 1998.
- Arora et al., 1971: Arora, R. B., Kapoor, V., Basu, N. & Jain, A. P. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (turmeric). *Indian J. Med. Res.*, **59**, 1289–1295, 1971.
- Battistutta et al., 2000: Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Papinutto, E., Zanotti, G. & Pinna, L.A. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29618–29622, 2000.
- Bech-Otschir et al., 2001: Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C. & Dubiel, W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.*, **20**, 1630–1639, 2001.
- Bech-Otschir et al., 2002: Bech-Otschir, D., Seeger, M. & Dubiel, W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Cell. Sci.*, **115**, 467–473, 2002.
- Benezra et al., 1990: Benezra, R., Davis, R., Lockshon, D., Turner, D. & Weintraub, H. The protein ID – a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49–59, 1990.
- Benezra et al., 2001: Benezra, R., Raffi, S. & Lyden, D. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene*, **20**, 8334–8341, 2001.
- Berse et al., 2004: Berse, M., Bounpheng, M., Huang, X., Christy, B., Pollmann, Ch. & Dubiel, W. Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome. *J. Mol. Biol.*, **343**, 361–370, 2004.
- Bianchi et al., 2003: Bianchi, E., Denti, S., Catena, R., Rossetti, G., Polo, S., Gasparian, S., Putignano, S., Rogge, L. & Pardi, R. Characterization of human constitutive photomorphogenesis protein 1, a RING finger ubiquitin

- ligase that interacts with Jun transcription factors and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 19682–19690, 2003.
- Bounpheng et al., 1999: Bounpheng, M. A., Dimas, J. J., Dodds, S. G. & Christy, B. A. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.*, **13**, 2257–2264, 1999.
- Bouvet et al., 1998: Bouvet, M., Bold, R. J., Lee, J., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Chiao, P. J., McConkey, D. J., Chandra, J., Chada, S., Fang, B., & Roth, J. A. Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, **5**, 681–688, 1998.
- Brooks et al., 2000: Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J. & Rivett, A. J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.*, **346**, 155–161, 2000.
- Bussolino et al., 1997: Bussolino, F., Mantovani, A. & Persico, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 251–256, 1997.
- Chen & Tan, 1998: Chen, Y.R. & Tan, T. H. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene*, **17**, 173–178, 1998.
- Christy et al., 1991: Christy, B. A., Sanders, L. K., Lau, L. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nathans, D. An ID-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1815–1819., 1991.
- Ciechanover, 1994: Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13–21, 1994.
- Claret et al., 1996: Claret, F. X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T. & Karin, M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, **383**, 453–457, 1996.
- Cohen et al., 2000: Cohen, H., Azriel, A., Cohen, T., Meraro, D., Hashmueli, S., Bech-Otschir, D., Kraft, R., Dubiel, W. & Levi, B. Z. Interaction between interferon consensus sequence-binding protein and COP9/signalosome subunit CSN2 (Trip15). A possible link between interferon regulatory factor signaling and the COP9/signalosome. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39081–39089, 2000.
- Cope et al., 2002: Cope, G. A., Suh, G. S., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V. & Deshaies, R. J. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608–611, 2002.
- de Candia et al., 2003: de Candia, P., Solit, D. B., Giri, D., Brogi, E., Siegel, P. M., Olshen, A. B., Muller, W. J., Rosen, N. & Benezra, R. Angiogenesis impairment in Id-deficient mice cooperates with an Hsp90 inhibitor to completely suppress HER2/neu-dependent breast tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12337–12342, 2003.
- Deed et al., 1996: Deed, R. W., Armitage, S. & Norton, J. D. Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23603–23606, 1996.
- Deed et al., 1997: Deed, R. W., Hara, E., Atherton, G. T., Peters, G. & Norton, J. D. Regulation of ID3 cell cycle function by Cdk2-dependent phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6815–6821, 1997.
- Deshaies, 1999: Deshaies, R. J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitinligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 435–467, 1999.

- Desprez et al., 1998: Desprez, P-Y., Lin, C. Q., Thomasset, N., Sympson, C. J., Bissell, M. J. & Campisi, J. A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein, ID1. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 4577–4588, 1998.
- Devary et al., 1991: Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. & Karin, M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 2804–2811, 1991.
- Dunn et al., 2002: Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A. & Gillespie, D. A. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal.*, **14**, 585–593, 2002.
- Eferl & Wagner, 2003: Eferl, R. & Wagner, E. F. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 859–868, 2003.
- Fajerman et al., 2004: Fajerman, I., Schwartz, A. L. & Ciechanover, A. Degradation of the Id2 developmental regulator: targeting via N-terminal ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 505–512, 2004.
- Fang & Kerppola, 2004: Fang, D. & Kerppola, T. K. Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *PNAS*, **101**, 14782–14787, 2004.
- Fang et al., 2002: Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Hunter, T., Copeland, N., Jenkins, N. & Liu, Y. C. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat. Immunol.*, **3**, 281–287, 2002.
- Ferrara, 2002: Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 795–803, 2002.
- Ferrara, 2001: Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **280**, C1358–C1366, 2001.
- Ferrara & Henzel, 1989: Ferrara, N. & Henzel, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **161**, 851–858, 1989.
- Ferrara et al., 2003: Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, **9**, 669–676, 2003.
- Folkman & Klagsbrun, 1987: Folkman, J. & Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science*, **235**, 442–447, 1987.
- Freilich et al., 1999: Freilich, S., Oron, E., Kapp, Y., Nevo-Caspi, Y., Orgad, S., Segal, D. & Chamovitz, D.A. The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.*, **9**, 1187–1190, 1999.
- Fu et al., 2001: Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M. H. & Vierstra, R. D. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.*, **20**, 7096–7107, 2001.
- Fuchs et al., 1996: Fuchs, S. Y., Dolan, L., Davis, R. J. & Ronai, Z. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene*, **13**, 1531–1535, 1996.
- Glickman et al., 1998: Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. & Finley, D. A. subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9 signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615–623, 1998.
- Goldberg, 2003: Goldberg, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895–899, 2003.
- Groisman et al., 2003: Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., & Nakatani, Y. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially

- regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, **113**, 357–367, 2003.
- Guerra & Issinger, 1999: Guerra, B. & Issinger, O. G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, **20**, 391–408, 1999.
- Gupta & Qin, 2003: Gupta, M. K. & Qin, R. Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 1144–1155, 2003.
- Hall et al., 2004: Hall, M. C., Warren, E. N. & Borchers, C. H. Multi-kinase phosphorylation of the APC/C activator Cdh1 revealed by mass spectrometry. *Cell Cycle*, **3**, 1278–1284, 2004.
- Hara et al., 1997: Hara, E., Hall, M. & Peters, G. Cdk2-dependent phosphorylation of ID2 modulates activity of E2A-related transcription factors. *EMBO J.*, **16**, 101–110, 1997.
- Hara et al., 1994: Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H. & Oda, K. Id-related genes encoding HLH proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2139–2145, 1994.
- Harari-Steinberg & Chamovitz, 2004: Harari-Steinberg, O. & Chamovitz, D. A. The COP9 signalosome: Mediating Between Kinase Signaling and Protein Degradation. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **5**, 185–189, 2004.
- Hardtke et al., 2000: Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K. & Deng, X.W. HY5 stability and activity in arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.*, **19**, 4997–5006, 2000.
- Hasmeda & Polya, 1996: Hasmeda, M. & Polya, G. M. Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry*, **42**, 599–605, 1996.
- Haworth & Avkiran, 2001: Haworth, R.S. & Avkiran, M. Inhibition of protein kinase D by resveratrol. *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1647–1651, 2001.
- Hayami et al., 2005: Hayami, R., Sato, K., Wu, W., Nishikawa, T., Hiroi, J., Ohtani-Kaneko, R., Fukuda, M. & Ohta, T. Down-regulation of BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase by CDK2. *Cancer Res.*, **65**, 6–10, 2005.
- Henke et al., 1999: Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M. & Dubiel, W. Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid. *Mol. Biol. Rep.*, **26**, 29–34, 1999.
- Henry et al., 2003: Henry, T. D., Annex, B. H., McKendall, G. R., Azrin, M. A., Lopez, J. J., Giordano, F. J., Shah, P. K., Willerson, J. T., Benza, R. L., Berman, D. S., Gibson, C. M., Bajamonde, A., Rundle, A. C., Fine, J. & McCluskey, E. R. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation*, **107**, 1359–1365, 2003.
- Hershko, 1997: Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**, 788–799, 1997.
- Hershko & Ciechanover, 1998: Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479, 1998.
- Hill et al., 1994: Hill, C. S., Wynne, J. & Treisman, R. Serum-regulated transcription by serum response factor (Srf) - a novel role for the DNA binding domain. *EMBO J.*, **13**, 5421–5432, 1994.
- Huang et al., 1992: Huang, H. C., Chang, J. H., Tung, S. F., Wu, R. T., Foegh, M. L. & Chu, S. H. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 359–364, 1992.
- Huang et al., 1994: Huang, M. T., Lou, Y. R., Ma, W., Newmark, H. L., Reuhl, K. R. & Conney, A. H. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res.*, **54**, 5841–5847,

1994.

- Iavarone et al., 1994: Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J. & Israel, M. A. The helix-loop-helix protein ID2 enhances cell proliferation and binds to the Retinoblastoma protein. *Genes and Dev.*, **8**, 1270–1284, 1994.
- Johnson et al., 1996: Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J. & Konieczny, S. F. Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1604–1613, 1996.
- Kalebic et al., 1983: Kalebic, T., Garbisa, S., Glaser, B. & Liotta, L. A. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science*, **221**, 281–283, 1983.
- Kapelari et al., 2000: Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R. & Dubiel, W. Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J. Mol. Biol.*, **300**, 1169–1178, 2000.
- Karin, 1995: Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483–16486, 1995.
- Karin & Ben-Neriah, 2000: Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 621–663, 2000.
- Kerbel & Folkman, 2002: Kerbel, R. & Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 727–739, 2002.
- Kim et al., 2003: Kim, J. H., Park, K. C., Chung, S. S., Bang, O. & Chung, C. H. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem*, **134**, 9–18, 2003.
- Krzystolik et al., 2002: Krzystolik, M. G., Afshari, M. A., Adamis, A. P., Gaudreault, J., Gragoudas, E. S., Michaud, N. A., Li, W., Connolly, E., O'Neill, C. A. & Miller, J. W. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch. Ophthalmol.*, **120**, 338–346, 2002.
- Kwok et al., 1999: Kwok, S. F., Staub, J. M. & Deng, X. W. Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J. Mol. Biol.*, **285**, 85–95, 1999.
- Lamph et al., 1988: Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. & Verma, I. M. Induction of the oncogene jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, **334**, 629–631, 1988.
- Lasorella et al., 2000: Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature*, **407**, 592–598, 2000.
- Lasorella et al., 2001: Lasorella, A., Uo, T. & Iavarone, A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene*, **20**, 8326–8333, 2001.
- LeCouter et al., 2001: LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A., Peale, F., Gurney, A., Hillan, K. J. & Ferrara, N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, **412**, 877–884, 2001.
- Lee, 2001: Lee, H. Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 11–20, 2001.
- Lee et al., 1987a: Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. & Tjian, R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, **325**, 368–372, 1987.
- Lee et al., 1987b: Lee, W., Mitchell, P. & Tjian, R. Purified transcription factor AP-

- 1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *1987*, **49**, 741–752, *Cell*.
- Levy et al., 1995: Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. & Goldberg, M. A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13333–13340, 1995.
- Li et al., 2004: Li, H., Gerald, W. L. & Benezra, R. Utilization of Bone Marrow-Derived Endothelial Cell Precursors in Spontaneous Prostate Tumors Varies with Tumor Grade. *Cancer Res.*, **64**, 6137–6143, 2004.
- Lin et al., 2000: Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillet, C. E., Campisi, J. & Desprez, P-Y. A role for ID1 in the aggressive phenotype and steroid response of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **60**, 1332–1340, 2000.
- Lluis et al., 2005: Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. & Munoz-Canoves, P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.*, **24**, 974–984, 2005.
- Longo et al., 2002: Longo, R., Sarmiento, R., Fanelli, M., Capaccetti, B., Gattuso, D. & Gasparini, G. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis*, **5**, 237–256, 2002.
- Lyapina et al., 2001: Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D. A., Wei, N. & Deshaies, R. J. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, **292**, 1382–1385, 2001.
- Lyden et al., 2001: Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A. S., Hajjar, K. A., Manova, K., Benezra, R. & Rafii, S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.*, **7**, 1194–1201, 2001.
- Lyden et al., 1999: Lyden, D., Young, E. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. & Benezra, R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, **401**, 670–677, 1999.
- Makinen et al., 2002: Makinen, K., Manninen, H., Hedman, M., Matsi, P., Mussalo, H., Alhava, E. & Yla-Herttuala, S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.*, **6**, 127–133, 2002.
- Malterud et al., 1993: Malterud, K. E., Farbro, T. L., Huse, A. E. & Sund, R. B. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology*, **47 (Suppl. 1)**, 77–85, 1993.
- Massari & Murre, 2000: Massari, M. E. & Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 429–440, 2000.
- McNamara et al., 1998: McNamara, D. A., Harmey, J. H., Walsh, T. N., Redmond, H. P. & Bouchier-Hayes, D. J. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br. J. Surg.*, **85**, 1044–1055, 1998.
- Mullally & Fitzpatrick, 2002: Mullally, J. E. & Fitzpatrick, F. A. Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death. *Mol. Pharmacol.*, **62**, 351–358, 2002.
- Mundt et al., 1999: Mundt, K.E., Porte, J., Murray, J.M., Brikos, C., Christensen, P.U., Caspari, T., Hagan, I.M., Millar, J.B., Simanis, V., Hofmann, K. & Carr, A.M. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has

- a role in S phase. *Curr. Biol.*, **9**, 1427–1430, 1999.
- Musti et al., 1997: Musti, A. M., Treier, M. & Bohmann, D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*, **275**, 400–402, 1997.
- Nagata et al., 1995: Nagata, Y., Shoji, W., Obinata, M. & Todokoro, K. Phosphorylation of helix-loop-helix proteins ID1, ID2 and ID3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 916–926, 1995.
- Nateri et al., 2004: Nateri, A. S., Riera-Sans, L., Da Costa, C. & Behrens, A. The Ubiquitin Ligase SCFFbw7 Antagonizes Apoptotic JNK Signaling. *Science*, **303**, 1374–1378, 2004.
- Naumann et al., 1999: Naumann, M., Bech-Otschir, D., Huang, X., Ferrell, K. & Dubiel, W. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35297–35300, 1999.
- Neufeld et al., 1999: Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, **13**, 9–22, 1999.
- Nordgard et al., 2001: Nordgard, O., Dahle, O., Andersen, T. O. & Gabrielsen, O. S. JAB1/CSN5 interacts with the GAL4 DNA binding domain: a note of caution about two-hybrid interactions. *Biochimie*, **83**, 969–971, 2001.
- Norton, 2000: Norton, J. D. ID proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.*, **113**, 3897–3905, 2000.
- Norton et al., 1998: Norton, J. D., Craggs, G., Deed, R. W. & Sablitzky, F. ID helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol.*, **8**, 58–65, 1998.
- Norton & Atherton, 1998: Norton, J.D. & Atherton, G.T. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2371–2381, 1998.
- O'Toole et al., 2003: O'Toole, P. J., Inoue, T., Emerson, L., Morrison, I. E., Mackie, A. R., Cherry, R. J. & Norton, J. D. Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45770–45776, 2003.
- Ohtani et al., 2001: Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G. & Hara, E. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, **409**, 1067–1070, 2002.
- Osterlund et al., 1999: Osterlund, M. T., Ang, L. H. & Deng, X. W. The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.*, **9**, 113–118, 1999.
- Osterlund et al., 2000: Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. & Deng, X. W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, **405**, 462–466, 2000.
- Park et al., 1998: Park, S., Lee, D. K. & Yang, C. H. Inhibition of fos-jun-DNA complex formation by dihydroguaiaretic acid and in vitro cytotoxic effects on cancer cells. *Cancer Lett.*, **127**, 23–28, 1998.
- Peng et al., 2003: Peng, Z., Shen, Y., Feng, S., Wang, X., Chitteti, B. N., Vierstra, R. D. & Deng, X. W. Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. *Curr. Biol.*, **13**, R504–R505, 2003.
- Pickart, 2001: Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 503–533, 2001.
- Pollmann et al., 2001: Pollmann, C., Huang, X., Mall, J., Bech-Otschir, D., Naumann, M. & Dubiel, W. The constitutive photomorphogenesis 9

- signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res.*, **61**, 8416–8421, 2001.
- Prabhu et al., 1997: Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S. T. & Sun, X-H. Regulation of expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 by E2A and ID proteins. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 5888–5896, 1997.
- Pray et al., 2002: Pray, T. R., Parlati, F., Huang, J., Wong, B. R., Payan, D. G., Bennett, M. K., Issakani, S. D., Molineaux, S. & Demo, S. D. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist. Updat.*, **5**, 249–258, 2002.
- Reddy & Lokesh, 1994: Reddy, A. C. & Lokesh, B. R. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol. Cell. Biochem.*, **137**, 1–8, 1994.
- Riechmann et al., 1994: Riechmann, V., van Cruchten, I. & Sablitzky, F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 749–755, 1994.
- Ruzinova & Benezra, 2003: Ruzinova, M. B. & Benezra, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.*, **13**, 410–418, 2003.
- Ruzinova et al., 2003: Ruzinova, M. B., Schoer, R. A., Gerald, W., Egan, J. E., Pandolfi, P. P., Rafii, S., Manova, K., Mittal, V., & Benezra, R. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell*, **4**, 277–289, 2003.
- Sajithlal et al., 1998: Sajithlal, G. B., Chithra, P. & Chandrakasan, G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochem Pharmacol.*, **56**, 1607–1614, 1998.
- Sakurai et al., 2004: Sakurai, D., Tsuchiya, N., Yamaguchi, A., Okaji, Y., Tsuno, N. H., Kobata, T., Takahashi, K., & Tokunaga, K. Crucial Role of Inhibitor of DNA Binding/Differentiation in the Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Activation and Angiogenic Processes of Human Endothelial Cells. *J. Immunol.*, **173**, 5801–5809, 2004.
- Scheffner et al., 1993: Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 und E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase complex in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495–505, 1993.
- Schwechheimer et al., 2001: Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W. L., Lyapina, S., Deshaies, R. J., Gray, W. M., Estelle, M. & Deng, X. W. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science*, **292**, 1379–1382, 2001.
- Seeger et al., 1998: Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R. & Dubiel, W. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26 S proteasome subunits. *FASEB J.*, **12**, 469–478, 1998.
- Senger et al., 1983: Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. & Dvorak, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983–985, 1983.
- Shaulian & Karin, 2001: Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390–2400, 2001.
- Shaulian & Karin, 2002: Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, **4**, E131–E136, 2002.
- Shaulian et al., 2000: Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F. & Karin, M. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for

- exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, **103**, 897–907, 2000.
- Shweiki et al., 1992: Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843–845, 1992.
- Sikder et al., 2003: Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B. & Alani, R. M. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell*, **3**, 525–530, 2003.
- Sobrero & Bruzzi, 2005: Sobrero, A. & Bruzzi, P. Bevacizumab Plus Fluorouracil: The Value of Being Part of a Developing Story. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 1–3, 2005.
- Spain et al., 1996: Spain, B. H., Bowdish, K. S., Pacal, A. R., Staub, S. F., Koo, D., Chang, C.-Y., Xie, W., & Colicelli, J. Two human cDNAs, including a homolog of Arabidopsis FUS6 (COP11), suppress G-protein and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6698–6706, 1996.
- Sreejayan & Rao, 1994: Sreejayan und Rao, M. N. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 1013–1016, 1994.
- Street et al., 2002: Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F. V. Jr., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J. L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H. P., Carano, R. A. & Filvaroff, E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9656–9661, 2002.
- Sun et al., 1991: Sun, X-H., Copeland, N. G., Jenkins, N. & Baltimore, D. ID proteins, ID1 and ID2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 5603–5611, 1991.
- Sun et al., 2002: Sun, Y., Wilson, M.P. & Majerus, P.W. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J. Biol. Chem.*, **277**, 45759–45764, 2002.
- Sunwoo et al., 2001: Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Bancroft, C. C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P. & Van Waes, C. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kB, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1419–1428, 2001.
- Suzuki et al., 2002: Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S. F., Matsui, M. & Deng, X. W. Arabidopsis COP10 is an ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes & Dev.*, **16**, 554–559, 2002.
- Tanaka et al., 2001: Tanaka, K., Kawakami, T., Tateishi, K., Yashiroda, H. & Chiba, T. Control of IkappaBalpha proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie*, **83**, 351–356, 2001.
- Tomoda et al., 1999: Tomoda, K., Kubota, Y. & Kato, J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, **398**, 160–165, 1999.
- Tournay & Benezra, 1996: Tournay, O. & Benezra, R. Transcription of the dominant negative helix-loop-helix protein ID1 is regulated by a protein complex containing the immediate early response gene, Egr-1. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2418–2430, 1996.
- Treier et al., 1994: Treier, M., Staszewski, L. M. & Bohmann, D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, **78**, 787–798, 1994.
- Tsuge et al., 2001: Tsuge, T., Matsui, M. & Wei, N. The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J. Mol. Biol.*,

305, 1–9, 2001.

- Uhle et al., 2003: Uhle, S., Medalia, O., Waldron, R., Dumdey, R., Henklein, P., Bech-Otschir, D., Huang, X., Berse, M., Sperling, J., Schade, R. & Dubiel, W. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J.*, **22**, 1302–1312, 2003.
- van Dam & Castellazzi, 2001: van Dam, H. & Castellazzi, M. Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, **20**, 2453–2464, 2001.
- Van Lint et al., 2002: Van Lint, J., Rykx, A., Maeda, Y., Vantus, T., Sturany, S., Malhotra, V., Vandenheede, J. R. & Seufferlein, T. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell. Biol.*, **12**, 193–200, 2002.
- van Straaten et al., 1983: van Straaten, F., Muller, R., Curran, T., VanBeveren, C. & Verma, I. M. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3183–3187, 1983.
- Volpert et al., 2002: Volpert, O. V., Pili, R., Sikder, H. A., Nelius, T., Zaichuk, T., Morris, C., Shiflett, C. B., Devlin, M. K., Conant, K. & Alani, R.M. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell*, **2**, 473–483, 2002.
- von Arnim, 2003: von Arnim, A. G. On again - off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation. *Curr. Op. Plant Cell*, **6**, 520–529, 2003.
- Wei & Deng, 1999: Wei, N. & Deng, X.-W. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet.*, **15**, 98–103, 1999.
- Wei et al., 1994: Wei, N., Chamovitz, D.A. & Deng, X.W. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, **78**, 117–124, 1994.
- Wei et al., 1998: Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M. & Deng, X.W. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr. Biol.*, **8**, 919–922, 1998.
- Wernert et al., 1999: Wernert, N., Stanjek, A., Kiriakidis, S., Hügel, A., Jha, H. C., Mazitschek, R. & Giannis, A. Inhibierung der Angiogenese in vivo durch ets-1-Antisense-Oligonucleotide - Hemmung der Expression des Ets-1-Transkriptionsfaktors durch das Antibiotikum Fumagillin. *Angew. Chem.* 1999, **111**, 3432–3435, 1999.
- Wertz et al., 2004: Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhang, Z., Dornan, D., Arnott, D., Deshaies, R. J. & Dixit, V. M. Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science*, **303**, 1371–1374, 2004.
- Wibley et al., 1996: Wibley, J., Deed, R., Jasiok, M., Douglas, K. & Norton, J. A homology model of the Id-3 helix-loop-helix domain as a basis for structure-function predictions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1294**, 138–146, 1996.
- Wilson et al., 2001: Wilson, M.P., Sun, Y., Cao, L. & Majerus, P.W. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40998–41004, 2001.
- Winter et al., 2004: Winter, M., Milne, D., Dias, S., Kulikov, R., Knippschild, U., Blattner, C. & Meek, D. Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. *Biochemistry*, **43**, 16356–16364, 2004.
- Wolf et al., 2003: Wolf, D. A., Zhou, C. & Wee, S. The COP9 signalosome: an

- assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 1029–1033, 2003.
- Yamamoto et al., 2005: Yamamoto, A., Friedlein, A., Imai, Y., Takahashi, R., Kahle, P. J. & Haass, C. Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 3390–3399, 2005.
- Yang et al., 2003: Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Steinberg, S. M., Chen, H. X. & Rosenberg, S. A. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 427–434, 2003.
- Yates et al., 1999: Yates, P. R., Atherton, G. T., Deed, R. W., Norton, J. D. & Sharrocks, A. D. ID helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF-ETS domain transcription factors. *EMBO J.*, **18**, 968–976, 1999.
- Yokota, 2001: Yokota, Y. Id and development. *Oncogene*, **20**, 8290–8298, 2001.
- Yokota et al., 1999: Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S. & Gruss, P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*, **397**, 702–706, 1999.
- Zandomeni, 1989: Zandomeni, R.O. Kinetics of inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on calf thymus casein kinase II. *Biochem. J.*, **262**, 469–473, 1989.
- Zhang et al., 1995: Zhang, L., Chang, C. J., Bacus, S. S. & Hung, M. C. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res.*, **55**, 3890–3896, 1995.
- Zhou et al., 2003: Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W. & Wolf, D. A. Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol. Cell.*, **11**, 927–938, 2003.

Anhang

Danksagung

Das Jahr der guten Zusammenarbeit mit den Kollegen der Arbeitsgruppe Dubiel war für mich eine intensiv erlebte Zeit, die mich nicht nur fachlich weitergebracht sondern auch persönlich sehr geprägt hat. Allen Kollegen danke ich deshalb für ihr freundliches Entgegenkommen, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Dubiel für die Ermöglichung dieser Arbeit und für seine intensive Betreuung während ihrer Durchführung. Für seine fachliche und persönliche Unterstützung möchte ich Christoph Berndt meinen Dank aussprechen. Mit ihm konnte ich auch über den Fachbereich hinausgehende Fragen angeregt diskutieren. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Xiaohua Huang und Dawadschargal Bech-Otschir für ihre bereitwillige Hilfe bei der Einführung in die neuen Methoden und die wissenschaftliche Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit. Für ihre hilfreiche Unterstützung im Labor, insbesondere bei den Phosphorylierungsexperimenten, möchte ich an dieser Stelle Renate Dumdey danken. Mein persönlicher Dank für die produktive Kritik meiner Dissertation richtet sich an Bettina Hetfeld und Christoph Berndt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Matthias Berse
Geburtsdatum und -ort	12.06.1976 in Cottbus
Geschlecht	männlich
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Kopenhagener Str. 38, 10437 Berlin

Studium

11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note: sehr gut (1,0) Gesamtnote: sehr gut (1,3)
04/2004 – 11/2004	Studium der Humanmedizin Charité – Universitätsmedizin Berlin
10/1997 – 04/2004	Studium der Humanmedizin Freie Universität Berlin

Zivildienst

08/1996 – 09/1997	Klinik für Innere Medizin Abteilung für Rheumatologie Carl-Thiem-Klinikum Cottbus
-------------------	---

Schulbildung

15.06.1996	Abitur, Gesamtnote: 1,0
1990-96	Max-Steenbeck-Gymnasium Cottbus
1983-90	20. POS Cottbus

Publikationen

Uhle, S., Medalia, O., Waldron, R., Dumdey, R., Henklein, P., Bech-Otschir, D., Huang, X., Berse, M., Sperling, J., Schade, R. & Dubiel, W. (2003) Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *Embo J.*, **22**, 1302–1312.

Berse, M., Bounpheng, M., Huang, X., Christy, B., Pollmann, C. & Dubiel, W. (2004) Ubiquitin-dependent Degradation of Id1 and Id3 is Mediated by the COP9 Signalosome. *J. Mol. Biol.*, **343**, 361–370.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 31.01.2006